

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit
mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg und Gießen

**Die Rolle des SCF/c-Kit-Signalweges für das klonogene
Überleben und Invasionsverhalten nach Photonenbestrahlung
in humanen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Miriam Farisai Saulich
aus Harare

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
04.06.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Burchert

Für Julia

Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde im Zeitraum von Oktober 2014 bis März 2016 an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Direktorin: Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic) der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, durchgeführt.

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. vet. F. Subtil angefertigt und durch Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic, Frau Dr. med. vet. F. Subtil und Herrn Dr. med. F. Eberle betreut. Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Projektes von der Behring-Röntgen-Stiftung e. V. und dem Verein für Krebsforschung am Standort Gießen e. V. gefördert und unterstützt. Wesentliche Ergebnisse der Arbeit wurden bereits in den Publikationen *Cancer cell motility is affected through 3D cell culturing and SCF/c-Kit pathway but not by X-irradiation*. (Eberle *et al.*, 2016) und *In cancer cell lines inhibition of SCF/c-Kit pathway leads to radiosensitization only when SCF is strongly over-expressed* (Eberle *et al.*, 2017) veröffentlicht.

Die vorliegende Arbeit ist dem Gebiet der Onkologie der Lunge und der Strahlentherapie zuzuordnen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
TABELLENVERZEICHNIS	XIII
FORMELVERZEICHNIS	XIV
1. EINLEITUNG	1
1.1. ÜBERBLICK	1
1.2. SCF UND C-KIT	3
1.2.1. Strukturelle und funktionelle Grundlagen	3
1.2.2. Tumorerkrankungen	5
1.3. STRAHLENWIRKUNG - PHYSIKALISCHE UND BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	7
1.3.1. Strahlenwirkung und -schäden	7
1.3.2. Klonogenes Überleben	8
1.4. INVASION VON TUMORZELLEN	9
1.4.1. Epitheliale-mesenchymale Transition - EMT	9
1.5. 2D- UND 3D-ZELLKULTUR	13
2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	15
3. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1. MATERIAL	16
3.1.1. Geräte	16
3.1.2. Hilfs- und Verbrauchsmaterial	17
3.1.3. Lösungen und Substanzen	18
3.1.4. Gebrauchslösungen und Gele	21
3.1.5. Computerprogramme	24
3.2. ZELLKULTUR	24
3.2.1. Zelllinien	24
3.2.2. Kultivierung	24
3.2.3. 2D- und 3D-Kultur	25
3.2.4. Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer Zählkammer	25

3.3.	VERSUCHSAUFBAU	26
3.4.	TRANSIENTE TRANSFEKTION	27
3.4.1.	siRNA-Sequenzen	27
3.4.2.	Durchführung	27
3.5.	BESTRAHLUNG	28
3.6.	KOLONIEBILDUNGSTEST	29
3.6.1.	Durchführung in 2D-Kultur	29
3.6.2.	Durchführung in 3D-Kultur	30
3.6.3.	Auswertung	30
3.7.	INVASIONSTEST	31
3.7.1.	Durchführung in 2D-Kultur	31
3.7.2.	Durchführung in 3D-Kultur	32
3.7.3.	Auswertung	32
3.8.	PROBENGEWINNUNG FÜR RNA- UND PROTEINEXTRAKTION.....	33
3.8.1.	Probengewinnung aus 2D-kultivierten Zellen	33
3.8.2.	Probengewinnung aus 3D-kultivierten Zellen	33
3.9.	QUANTITATIVE REAL-TIME REVERSE-TRANSKRIPTASE-POLYMERASE- KETTENREAKTION	33
3.9.1.	RNA-Gewinnung.....	34
3.9.2.	RNA-Isolation	34
3.9.3.	Quantitative Nukleinsäureanalyse.....	34
3.9.4.	Reverse Transkription- Herstellung von cDNA.....	35
3.9.5.	Quantitative Real-Time PCR.....	36
3.10.	WESTERN BLOT	42
3.10.1.	Proteinextraktion	42
3.10.2.	Proteinmessung	43
3.10.3.	Durchführung	43
3.10.4.	Auswertung mittels Densitometrie	45
3.11.	STATISTISCHE AUSWERTUNG	46
4.	ERGEBNISSE	47

4.1. EXPRESSION VON SCF UND C-KIT - GROßE UNTERSCHIEDE IN DEN UNTERSUCHTEN ZELLINIEN	47
4.1.1. SCF-Expression unter Bestrahlung - Keine Veränderung in den untersuchten Zelllinien	49
4.2. SCF-INHIBITION MITTELS siRNA	49
4.3. KLONOGENES ÜBERLEBEN UNTER BESTRAHLUNG IN 2D- UND 3D-KULTUR - SIGNIFIKANTER EINFLUSS DER KULTURBEDINGUNGEN IN BEIDEN ZELLINIEN	50
4.4. KLONOGENES ÜBERLEBEN UNTER SCF-INHIBITION - MODERATER EINFLUSS AUF PLATTIERUNGSEFFIZIENZ BEIDER ZELLINIEN.....	51
4.5. KLONOGENES ÜBERLEBEN UNTER BESTRAHLUNG UND SCF-INHIBITION - KEIN EINFLUSS DER BESTRAHLUNG DURCH SCF	52
4.6. EINFLUSS VON KULTURBEDINGUNGEN AUF DAS INVASIONSVERHALTEN DER UNTERSUCHTEN ZELLINIEN	53
4.6.1. Invasionsverhalten in 2D- und 3D-Kultur - Kulturbedingungen beeinflussen Invasionsverhalten signifikant	54
4.6.2. Expression EMT-assoziiierter Gene unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen - Signifikante Expressionsunterschiede	54
4.7. INVASIONSVERHALTEN UNTER SCF-INHIBITION IN 2D UND 3D - SCF BEEINFLUSST INVASIONSVERHALTEN.....	56
4.7.1. Expression EMT-assoziiierter Gene unter SCF-Inhibition - SCF beeinflusst Expression nicht	57
4.8. INVASIONSVERHALTEN UNTER BESTRAHLUNG IN 2D UND 3D - PHOTONENSTRAHLUNG BEEINFLUSST ZELLBEWEGLICHKEIT NICHT	57
4.8.1. EMT-assoziierte Gene unter Bestrahlung - Photonenstrahlung verändert Expression nicht	58
4.8.2. Invasionsverhalten unter SCF-Hemmung und Bestrahlung - SCF-Effekt auch unter Bestrahlung messbar und kein zusätzlicher Bestrahlungseffekt	60
5. DISKUSSION	62
5.1. UNTERSCHIEDE IN DER SCF- UND C-KIT-EXPRESSION DER GEWÄHLTEN NSCLC-ZELLINIEN	63
5.2. KLONOGENES ÜBERLEBEN DER UNTERSUCHTEN ZELLINIEN.....	65
5.2.1. Kulturbedingungen verändern die Strahlenempfindlichkeit.....	65

5.2.2. Die SCF-Inhibition hat nur einen untergeordneten Effekt auf das klonogene Überleben und die Strahlenempfindlichkeit.....	68
5.3. INVASIONSVERHALTEN	69
5.3.1. 3D-Kulturbedingungen erhöhen die Zellbeweglichkeit der NSCLC-Zellen durch eine EMT-ähnliche Veränderung der Proteinexpression	70
5.3.2. Der SCF/c-Kit-Signalweg beeinflusst das Invasionsverhalten unabhängig von EMT	72
5.3.3. Kein Einfluss auf das Invasionsverhalten durch Photonenbestrahlung ..	73
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	75
7. SUMMARY	77
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	78
9. ANHANG.....	102
9.1. VERÖFFENTLICHUNGEN	102
9.2. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	103
9.3. DANKSAGUNG	105

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
(c)DNA	(complementary) Desoxyribonukleinsäure
(r)DSB	(residueller) Doppelstrangbruch
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Basalmembran
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAM-DR	engl. <i>cell adhesion-mediated drug resistance</i>
CAM-RR	engl. <i>cell adhesion-mediated radiation resistance</i>
c-Kit	SCF-Ligant
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSC	engl. <i>cancer stem cells</i> (Krebsstammzellen)
ct	engl. <i>threshold cycle</i> (Schwellenwertzyklus)
D	Energiedosis
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat

ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxynukleinsäure, DNS)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPBS	engl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dsDNA	engl. <i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i> (Doppelstrang-DNS)
dTTP	Desoxythymintriphosphat
dUTP	Desoxyurintriphosphat
E	Effizienz
EC	Euchromatin
E-CAD	E-Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ERK 1 und 2	engl. <i>extracellular-signal regulated kinase 1 und 2</i>
et al.	lat. <i>et alii</i> (Maskulinum), <i>et aliae</i> (Femininum) oder <i>et alia</i> (und andere)
eV	Elektronenvolt
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	engl. <i>forward</i>
FA	fokale Adhäsionen
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
FGF	engl. <i>fibroblast growth factor</i>
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GC-Gehalt	Guanin- und Cytosin-Gehalt
GIST	gastrointestinale Stromatumoren
Glut-1	Glucose-Transporter-1

Grb2	engl. <i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray (Dosis)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser, <i>Aqua</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HC	Heterochromatin
HCl	Wasserstoffchlorid
HGF	engl. <i>hepatocyte growth factor</i>
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1
HRP	engl. <i>horse radish peroxidase</i>
HUVEC	engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
J	Joule
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LDH-A	Lactat Dehydrogenase A
LET	Linearer Energietransfer
IrEZM	lamininreiche Extrazelluläre Matrix
m	Meter oder milli (10 ⁻³)
M	molar oder Mega (10 ⁶)
max.	maximal
MDCK	engl. <i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEK1 und 2	engl. <i>Mitogen-activated protein kinase 1 und 2</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP-2 und 9	engl. <i>matrix metalloproteinase 2 und 9</i>
mol	Mol
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)

MT1-MMP	engl. <i>Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase</i>
mTOR	engl. <i>mammalian target of Rapamycin</i>
MV	Megavolt
MW	Mittelwert
n	nano (10^{-9}) oder Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
N-CAD	N-Cadherin
nm	Nanometer
NSCLC	engl. <i>non-small cell lung cancer</i>
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogendesaminase
PBS	engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGFR	engl. <i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PK-1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1
PE	Plattierungseffizienz
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
PTEN	engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	engl. <i>polyvinyl difluoride</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
qRT-RT-PCR	engl. <i>quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
R	engl. <i>reverse</i>
RBW (engl. RBE)	Relative biologische Wirksamkeit
RCF	engl. <i>Relative centrifugal force</i> (in g)

RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i>
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase oder eng. <i>real time</i>
s	Sekunde(n)
S.	Seite
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SCF	engl. <i>Stem cell factor</i>
SCLC	engl. <i>small-cell lung cancer</i>
SD	engl. <i>standard deviation</i> (Standardabweichung(en))
SDS	engl. <i>Sodium Dodecylsulfate</i>
SF	engl. <i>scatter-factor</i> oder engl. <i>survival fraction</i> (Überlebensfraktion)
SFKs	engl. <i>src family kinases</i> (Tyrosinkinasen der Src-Familie)
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SOD	engl. <i>superoxid dismutase</i>
SOS	engl. <i>Son of Sevenless</i>
ssDNA	engl. <i>single-stranded DNA</i>
TAE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (reverse Transkriptase)
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TBST	engl. <i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ	engl. <i>Transforming growth factor beta</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	engl. <i>Unit</i> (Aktivitätseinheit für Enzyme)
u. a.	unter anderem
UDG	Uracil DNA-Glykosylase
uPA	engl. <i>urokinase plasminogen activator</i>

UV	Ultraviolett
V	Volt oder Volumen
VEGF-A	engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor-A</i>
vgl.	vergleiche
VIM	Vimentin
z. B.	zum Beispiel
μ	mikro (10^{-6})

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der c-Kit-Aktivierung durch dimerisierte SCF-Moleküle.	4
Abbildung 2: Vorkommen von EMT und MET bei der Entstehung und Progression von Karzinomen.	11
Abbildung 3: Koloniebildungstest in 2D-Kultur nach verschiedenen Bestrahlungsdosen.	29
Abbildung 4: Koloniebildungstest in 3D-Kultur nach verschiedenen Bestrahlungsdosen.	30
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Invasions-Test-Kammern in 2D und 3D..	31
Abbildung 6: Schematische Darstellung der PCR.	37
Abbildung 7: SYBR-Green I-Floureszenzsignalgenerierung und Schmelzkurve.....	38
Abbildung 8: Expression von SCF und c-Kit in HUVECs und den Zelllinien H23 und H226 in 2D- und 3D-Kultur.....	48
Abbildung 9: c-Kit-Expression im Western Blot der untersuchten Zelllinien in 2D-Kultur.	48
Abbildung 10: SCF-Expression der Zelllinien H23 und H226 24 h nach Bestrahlung mit 0, 2 und 6 Gy in 2D- und 3D-Kultur.	49
Abbildung 11: SCF-Expression der Zelllinien H23 und H226 24 h nach transienter Transfektion mit siRNA-SCF (SCF) und als Kontrolle siRNA-control (ctr) in 2D- bzw. 3D-Kultur.	50
Abbildung 12: Klonogenes Überleben der Zelllinien H23 und H226 nach Photonenbestrahlung (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy) in 2D- und 3D-Kultur.	51
Abbildung 13: Plattierungseffizienz der Zelllinien H23 und H226 nach transienter Transfektion mit siRNA-SCF (SCF) und ungerichteter siRNA als Kontrolle (ctr) in 2D- und 3D-Kultur.....	52
Abbildung 14: Klonogenes Überleben der Zelllinien H23 (A) und H226 (B) nach SCF-Hemmung mittels siRNA (siSCF versus Kontrolle [sicontrol]) und Photonenbestrahlung (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy) in 2D- und 3D-Kultur.	53
Abbildung 15: Invasionsverhalten für H23- und H226-Zellen in 2D- und 3D-Kultur.	54
Abbildung 16: mRNA-Expression von Vimentin, N- und E-Cadherin in den Zelllinien H23 und H226 als 2-log-Verhältnis zwischen 2D- und 3D-Kultur.	55
Abbildung 17: Proteinexpression von Vimentin in den Zelllinien H23 und H226 im Western-Blot (A) mit relativer Expression (Dosimetrie, B) bei Vergleich der in 2D- und 3D-kultivierten Zellen.	55
Abbildung 18: Invasionsverhalten der Zelllinien H23 und H226 nach SCF-Hemmung in 2D- und 3D-Kultur.	56

Abbildung 19: Expression von Vimentin, N- und E-Cadherin in den Zelllinien H23 und H226 unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen 24 h nach transienter Transfektion mit siRNA-SCF.....	57
Abbildung 20: Invasionsverhalten der H23- und H226-Zellen nach Bestrahlung mit 0, 2 und 6 Gy in 2D- und 3D-Zellkultur.....	58
Abbildung 21: Expression EMT-assoziiierter Gene der Zelllinien H23 und H226 24 h nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy in Bezug auf nicht bestrahlte Zellen in 2D- und 3D-Kultur.....	59
Abbildung 22: Invasionsverhalten der Zelllinien H23 und H226 nach SCF-Hemmung in 2D- und 3D-Kultur und nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	17
Tabelle 2: Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 3: Verwendete Substanzen und Lösungen	20
Tabelle 4: Zusammensetzung verwendeter Gele	21
Tabelle 5: Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen	22
Tabelle 6: Zusammensetzung verwendeter Lösungen	23
Tabelle 7: Verwendete Computerprogramme	24
Tabelle 8: Versuchsgruppen	27
Tabelle 9: Verwendete siRNA-Sequenzen	27
Tabelle 10: Zusammensetzung Transfektionsgemisch	28
Tabelle 11: Bestrahlungsdosen entsprechend Versuchsaufbau	28
Tabelle 12: Primer	39
Tabelle 13: Primer-Effizienzen	40
Tabelle 14: Antikörper und Lösungen zur Verdünnung	45

Formelverzeichnis

Formel 1: Energiedosis	7
Formel 2: Linear-quadratisches Modell	8
Formel 3: Zelldichtebestimmung	26
Formel 4: Berechnung der Plattierungseffizienz	30
Formel 5: Berechnung der Überlebensfraktion	31
Formel 6: Berechnung der prozentualen Zellbeweglichkeit [%]	32
Formel 7: Berechnung der Primer-Effizienz	40
Formel 8: Berechnung des ΔC_t -Werts	42
Formel 9: Berechnung des $\Delta\Delta C_t$ -Werts	42

1. Einleitung

1.1. Überblick

In den Industriestaaten zählen Krebserkrankungen nach Herz-Kreislaferkrankungen zu den führenden Todesursachen (Ferlay *et al.*, 2015). Von den zahlreichen Krebsarten galt 2012 Lungenkrebs mit 19,4% als führende Krebstodesursache und häufigste (12,9%) Malignomerkrankung weltweit. In Deutschland lag die Zahl der Lungenkrebs-Neuerkrankungen 2012 bei 18.000 Frauen und 34.500 Männer. Die Prognose ist mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 21% bei Frauen und 16% bei Männern (Deutschland 2012) schlecht (Kaatsch *et al.*, 2015).

Maligne Erkrankungen der Lunge, auch Lungenkarzinome genannt, können orientierend in kleinzellige (engl. *small cell lung cancer*, SCLC) und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) eingeteilt werden, wobei NSCLCs mit etwa 85% die größere, heterogene Gruppe bilden (Rocco *et al.*, 2016). NSCLCs umfassen neben einigen seltenen Unterformen das Adenokarzinom (50%), das Plattenepithelkarzinom (etwa 30%) und die Großzelligen Karzinome (Janssen-Heijnen und Coebergh, 2003; Boolell *et al.*, 2015). Die therapeutischen Optionen bei NSCLCs umfassen die chirurgische Tumoresektion, die adjuvante und neoadjuvante Chemo- und Strahlentherapie (Goeckenjan *et al.*, 2011). Neben diesen konventionellen Therapieansätzen sind in den letzten Jahren zunehmend auf molekularbiologischer Tumoranalysen basierende, zielgerichtete Therapien hinzugekommen (Boolell *et al.*, 2015; Khanna *et al.*, 2016). Strahlentherapeutische Ansätze spielen gerade bei inoperablen Stadien der Erkrankung (Guckenberger *et al.*, 2014) und bei älteren Menschen zur lokalen Tumorkontrolle eine wichtige Rolle (Corso *et al.*, 2015). Allgemein stellt die Therapie maligner Tumoren mit Röntgenstrahlen seit Jahrzehnten eine wichtige und häufig angewendete Maßnahme dar (Delaney *et al.*, 2005). Hierbei erhöht sich dosisabhängig die Wahrscheinlichkeit den Tumor zu vernichten. Da mit steigender Strahlendosis auch die Wahrscheinlichkeit eines Normalgewebsschadens steigt, ist dies als therapielimitierender Faktor zu betrachten (Steel, 2002; Baumann *et al.*, 2004). Des Weiteren ist das Patientenüberleben maßgeblich von der Metastasierung des Tumors abhängig. Vikram *et al.* beschrieben ein erhöhtes Risiko für Invasion von Krebszellen und Metastasenbildung in bestrahlten Regionen nach Resektion von Kopf- und Halstumoren (Vikram *et al.*, 1984). Diese Beobachtung wurde durch aktuelle Studien bestätigt (Wild-Bode *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2011; Kuonen *et al.*, 2012). Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist bislang nur in Ansätzen verstanden. Bekannt ist, dass zur Ausbildung von Tochtergeschwülsten Zellen eines

Primärtumors die sogenannte Basalmembran und umgebendes Gewebe überwinden müssen, um in Lymph- oder Blutgefäße zu gelangen, wobei eine Art Transformationsprozess der Zelle, bekannt als endotheliale-mesenchymale Transition (engl. *endothelial to mesenchymal transition*, kurz EMT) ausschlaggebend zu sein scheint (Kalluri und Weinberg, 2009). Röntgenstrahlung wird als möglicher Stimulus der EMT beschrieben (Kuonen, Secondini und Rüegg, 2012) und so konnten Kuonen et al. nach Transplantation von Tumorgewebe in vorbestrahltes Brustgewebe zeigen, dass die Tumoren weniger Angiogenese, eine höhere Hypoxie und Invasivität sowie mehr Metastasen aufwiesen als Tumoren in einem nicht bestrahlten Gewebebett. Mitverantwortlich sei hierfür der SCF/cKit-Signalweg (Kuonen et al., 2012). Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit kann nach Aktivierung mittels ihres Liganden *Stem cell factor* (SCF) über verschiedene Signaltransduktionskaskaden elementare Regulationsmechanismen beeinflussen, welche sich auf das Überleben, sowie das Migrations- und Proliferationsverhalten der Zellen auswirken. Dies spielt nicht nur physiologisch in verschiedensten Körperzellen eine Rolle, sondern auch in Tumorzellen (Lennartsson und Rönstrand, 2012).

C-Kit wird nicht nur als Protoonkogen beschrieben, sondern ist auch in Kombination mit einem erhöhten SCF-Level in Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert (Stanulla et al., 1995; Pittoni et al., 2011; Heldin und Lennartsson, 2013; Perumal et al., 2014). Dementsprechend geriet c-Kit als Ansatzpunkt einer tumorspezifischen Therapie in den Fokus, und Krystal et al. konnten zeigen, dass das Wachstum von SCLC-Zellen über eine Blockade des c-Kit/SCF-Signalweg mittels Tyrosinkinase-Hemmer unterdrückt werden konnte (Krystal et al., 2001). Jedoch merken Ashman und Griffith an, dass aufgrund von Resistenzentwicklung während der Therapie eine Heilung allein durch c-Kit-Hemmung fraglich sei (Ashman und Griffith, 2013). Eine effektive Kombinationstherapie, beispielsweise mit Bestrahlung, erscheint daher sinnvoll, insbesondere vor dem Hintergrund, dass eine mögliche Strahlenresistenz durch eine SCF-vermittelte c-Kit-Aktivierung induziert wird (Shui et al., 1995; Maddens et al., 2002; Perez-Losada et al., 2003). Die Strahlenresistenz scheint jedoch abhängig vom Zelltyp zu variieren (Holdhoff et al., 2005; Oertel et al., 2006; Ranza et al., 2009; Qiao et al., 2013).

Zusammenfassend lässt der SCF/c-Kit-Signalweg somit an einen effizienten Ansatzpunkt für die Tumorthherapie denken, da über ihn sowohl Proliferation, Invasion als auch die Strahlenresistenz beeinflusst werden können. Inwieweit dies auch für NSCLC-Tumoren zutrifft, ist bisher nicht bekannt.

1.2. SCF und c-Kit

Der Wachstumsfaktor Stammzellfaktor (engl. *stem cell factor*, kurz SCF), auch Kit-Ligand oder *steel factor* genannt, wird unter anderem von Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert und bindet an den Tyrosinkinase-Rezeptor c-Kit (Lennartsson und Rönstrand, 2012).

1.2.1. Strukturelle und funktionelle Grundlagen

SCF existiert in zwei verschiedenen Formen, membrangebunden oder löslich. Das hierfür codierende Gen findet sich beim Menschen auf Chromosom 12 (Ropers und Craig, 1989) und umfasst 9 Exons (Martin *et al.*, 1990). Während beide Isoformen von SCF als Monomer vorliegen, kann eine Aktivierung von c-Kit nur nach Dimerisierung erfolgen. Hierbei bestehen qualitative und quantitative Signalunterschiede je nach Isoform der aktivierenden Moleküle (Lennartsson und Rönstrand, 2012).

Als Mitglied der Familie der Tyrosinkinasen (Typ-III-Rezeptor) handelt es sich bei c-Kit um ein Transmembranprotein. Durch 21 Exons codiert, findet sich das Gen auf Chromosom 4 des menschlichen Genoms (D'Auriol *et al.*, 1988). Sein molekularer Aufbau gliedert sich in eine extrazelluläre (5-Ig-like Domäne, D1-5), transmembranäre und juxtamembranäre Domäne, sowie eine intrazelluläre Region, der Tyrosinkinasendomäne. Die Tyrosinkinasendomäne ist weiter durch einen Kinase-Einschub geteilt. Eine Aktivierung von c-Kit ist nur über Dimerisierung zweier Rezeptoren möglich. Hierbei bindet je ein Monomer eines SCF-Dimers an die ersten drei Ig-like Domänen je eines c-Kit-Moleküls (siehe auch Abbildung 1). Daraufhin kommt es zur Konformationsänderung der extrazellulären Regionen, so dass sich die transmembranären Domänen annähern, was wiederum eine Phosphorylierung der intrazellulären Abschnitte erlaubt. Der juxtamembranösen Domäne kommt hierbei eine regulierende Funktion zu (Blume-Jensen *et al.*, 1991).

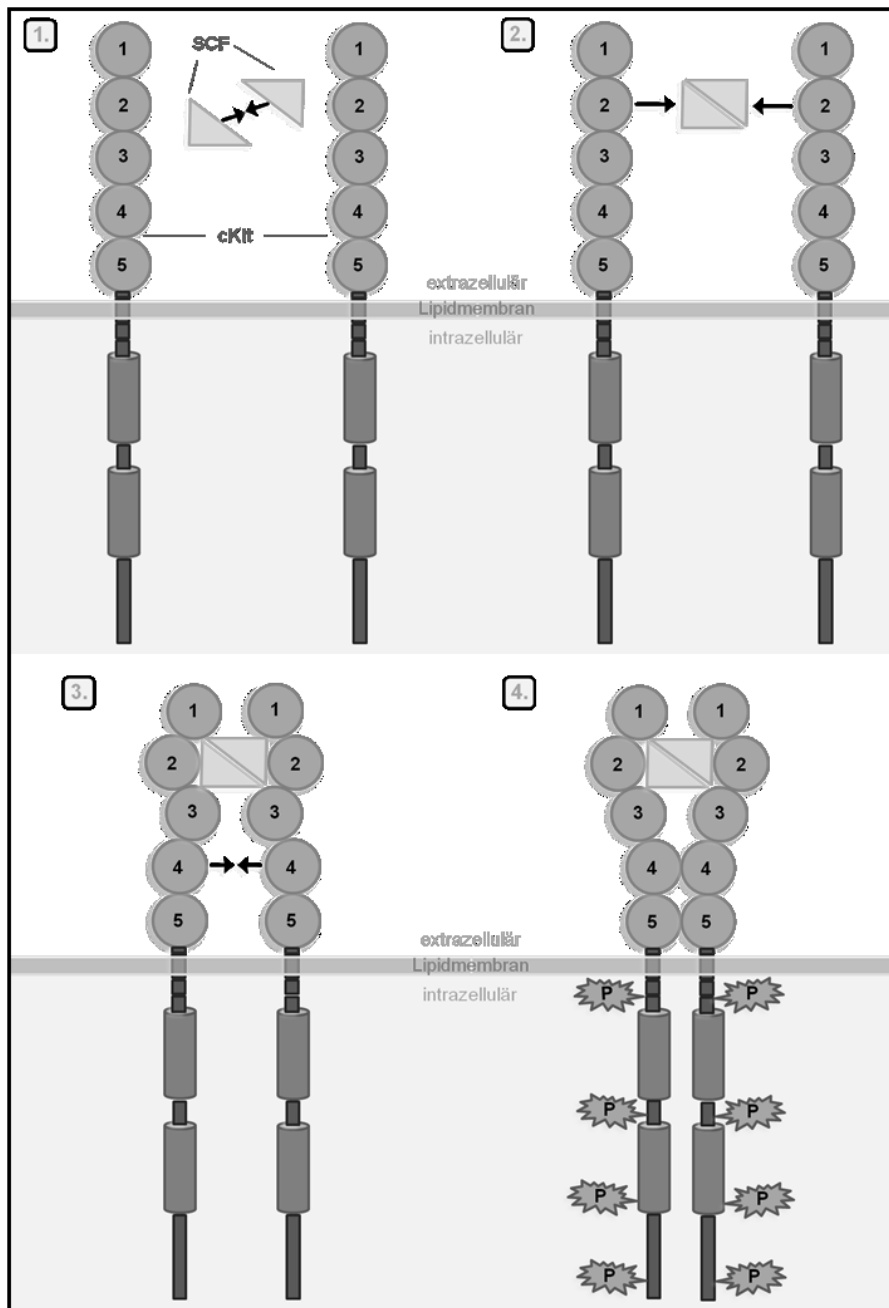


Abbildung 1: Schematische Darstellung der c-Kit-Aktivierung durch dimerisierte SCF-Moleküle.

Modifiziert nach Lennartsson und Ronnstrand: *Schematic representation of SCF-induced c-Kit activation*. In: *Physiol Rev* 92: 1619–1649, 2012.

Durch die extrazelluläre Aktivierung und dadurch intrazelluläre Autophosphorylierung können intrazellulär verschiedene Signaltransduktionswege angestoßen werden. Diese Signalkaskaden wurden an unterschiedlichen Zellen, hauptsächlich an Mastzellen, untersucht.

Der PI3-Kinase Signalweg wird durch die Phosphatidylinositol-3'-Kinase initiiert, die einen Inositol-Ring der Zellmembranlipide phosphoryliert (Morgan, Smith und Parker, 1990). So entstandenes PIP3 ist in der Lage, die Serin/Threonin-Kinase AKT zu aktivieren und somit entscheidend Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Zelle zu nehmen (Blume-Jensen, Janknecht und Hunter, 1998).

Viele essentielle biologische Funktionen durch SCF/c-Kit-Aktivierung werden über MAP-Kinasen vermittelt. Einfluss auf Proliferation, Zelldifferenzierung und Überleben der Zelle wird in diesem Zusammenhang unter anderem dem Ras/Erk-Signalweg zugeschrieben: Durch Bindung des *Growth factor receptor bound protein 2* (Grb2) kann SOS zunächst hieran binden und im Folgenden das G-Protein RAS aktivieren. Es folgen weitere Kinaseaktivierungen, wobei über B-Raf zunächst MEK1 und 2 phosphoryliert werden, die wiederum eine Phosphorylierung von ERK 1 und 2 bewirken. Die Kaskade mündet in einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Murphy *et al.*, 2002; Yasuda und Kurosaki, 2008).

Auch die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen der Src-Familie (SFks) können durch SCF/c-Kit aktiviert werden. Proliferation, Chemotaxis und Überleben werden durch sie maßgeblich beeinflusst (Bromann, Korkaya und Courtneidge, 2004).

Neben der essentiellen Bedeutung für Proliferation, Migration, Überleben und Differenzierung von Keimzellen, die Hämatopoese, Melanozyten und die Fruchtbarkeit (Ashman, 1999) wurde auch der Einfluss von c-Kit und SCF auf den Gastrointestinaltrakt (Huizinga *et al.*, 1995), das Nervensystem (Jin *et al.*, 2002) und die Vaskulogenese (Heissig *et al.*, 2003) untersucht. Zudem beschreiben Lindsey *et al.* einen Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Lungengewebsintegrität (Lindsey *et al.*, 2011).

1.2.2. Tumorerkrankungen

Auch in malignen Erkrankungen ist der SCF/c-Kit-Signalweg von Bedeutung. So sind Mutationen im c-Kit-Gen häufig und treten in unterschiedlichsten Formen auf (Lennartsson und Rönstrand, 2012). Betroffen sind häufig die juxtamembranöse und extrazelluläre Region, sowie die Kinase-Domäne (Antonescu, 2011). Auch eine autokrine Schleife ist beschrieben (Stanulla *et al.*, 1995).

c-Kit erwies sich als Protoonkogen, da häufig ein aktiver SCF/c-Kit-Signalweg in Tumoren und präkanzerösen Geweben beobachtet werden konnte (Stanulla *et al.*, 1995; Yasuda *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Kamlah *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2015). Viele Tumoren mit hohen Leveln an SCF/c-Kit zeigten eine schlechte Prognose

(Yasuda *et al.*, 2006, 2007; Marech, Gadaleta und Ranieri, 2014; Wang *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2015).

Pittoni *et al.* teilten in diesem Zusammenhang maligne Erkrankungen in zwei Gruppen. Sie unterschieden Tumoren, deren Ursprungszellen c-Kit exprimieren wie gastrointestinale Strumatumoren, Keimzelltumoren und Melanome von malignen Geweben, die erst nach Entartung eine c-Kit-Expression aufweisen. Hierunter zählten sie SCLCs, Kolonkarzinome, adenoid-zystische Karzinome und Hirntumoren. Während eine c-Kit-Aktivierung in der ersten Gruppe maßgeblichen Einfluss auf die Tumorentstehung hat, kommt ihr in Gruppe zwei eine wichtige Rolle in der Tumorprogression zu (Pittoni *et al.*, 2011).

All diese Beobachtungen legen nahe, dass es sich bei SCF/c-Kit um einen Ansatzpunkt für eine spezifische Tumorthherapie handeln könnte, vor allem nachdem es gelang, c-Kit mittels des Tyrosinkinasehemmers Imatinib zu inhibieren (Buchdunger *et al.*, 2000; Heinrich *et al.*, 2000). Insbesondere zur Therapie gastrointestinaler Strumatumoren (GIST) erwies sich Imatinib als effektives Medikament (Tuveson *et al.*, 2001). Inzwischen finden sich zahlreiche Studien, die eine effektive Unterdrückung von Tumorwachstum und -metastasierung durch Tyrosinkinasehemmer bestätigen (Wang *et al.*, 2000; Krystal *et al.*, 2001; Carlino, Todd und Rizos, 2014; Iqbal und Iqbal, 2014). Der Einsatz von Imatinib zur gezielten Therapie ist unter anderem für Leukämien (ALL, AML, CML), GIST, Seminome, Sarkome und SCLC beschrieben (Müller-Tidow *et al.*, 2007). *In vitro* mit Imatinib behandelte c-Kit-positive NSCLC-Tumorzellen sprachen ebenfalls auf die Therapie an (Donnenberg *et al.*, 2012).

Eine Kombinationstherapie des Inhibitor mit Bestrahlung erscheint zum einen aufgrund auftretender Resistenzen (Gorre *et al.*, 2001; Tamborini *et al.*, 2004) sinnvoll. Zum anderen aufgrund der Tatsache, dass SCF/c-Kit eine Strahlenresistenz induzieren könnten (Maddens *et al.*, 2002; Perez-Losada *et al.*, 2003). Damit könnte ein doppelter Benefit durch c-Kit-Hemmung erreicht werden. In diesem Zusammenhang scheint eine Imatinib-vermittelte Strahlensensibilisierung jedoch von der Zellart abhängig zu sein. Denn Holdhoff *et al.* konnten für die humane Glioblastomzelllinie RuSi-RS1 eine gesteigerte Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung nach Behandlung mit Imatinib zeigen, während die ebenfalls untersuchte Brustkrebszelllinie BT20 und die Kolonkarzinomzelllinie WiDr bei gleichem c-Kit-Spiegel keine Sensibilisierung aufwiesen (Holdhoff *et al.*, 2005).

Shui *et al.* konnten durch SCF-Stimulation keine höhere Überlebensrate nach Bestrahlung in Lymphom-, Brustkrebs- und SCLC-Zellen feststellen (Shui *et al.*, 1995),

während Kamlah et al. in einer NSCLC-Zelllinie, A549, eine strahleninduzierte SCF-Expressionssteigerung beschrieben und nach spezifischer SCF-Hemmung in Kombination mit Photonenbestrahlung eine Abnahme der Tumorangiogenese demonstrierten (Kamlah *et al.*, 2011).

In wieweit die NSCLC-Zelllinien H23 und H226 eine SCF/c-Kit-abhängige Strahlenwirkung zeigen, ist bislang nicht geklärt und soll unter anderem in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.3. Strahlenwirkung - physikalische und biologische Grundlagen

In dieser Arbeit wurde ultraharte Röntgenstrahlung, die durch einen Linearbeschleuniger erzeugt wurde und heutzutage meist Anwendung zur Strahlentherapie findet, verwendet. Röntgenstrahlung zählt, wie die Gammastrahlung, zur Photonenstrahlung und damit handelt es sich um energiereiche ionisierende Strahlung (Krieger und Petzold, 1992). Grundsätzlich kommt es beim Auftreffen ionisierender Strahlung auf Materie zur Energieabgabe. Werden hierbei Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben, spricht man von Anregung, ist die Energie so groß, dass ein Elektron hingegen aus dem Atom bzw. Molekül herausgeschleudert wird, liegt eine Ionisation vor (Mortimer und Müller, 2007; Hall und Giaccia, 2011). Durchdringt ionisierende Strahlung Materie, wird vom Gewebe Energie aufgenommen, die sog. Energiedosis. Sie wird in Gray (Gy) angegeben (Herrmann, Baumann und Dörr, 2006), so dass gilt:

$$1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}}$$

Formel 1: Energiedosis

1.3.1. Strahlenwirkung und -schäden

Prinzipiell entfaltet ionisierende Strahlung ihre Wirkung in biologischen Geweben direkt oder indirekt. Wichtigstes intrazelluläres Ziel (*Target*) stellt hierbei die DNA dar, da deren Schädigung zu Mutationen bis hin zum Zelluntergang führen kann.

Eine direkte Schädigung bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Energieabsorption innerhalb des gleichen Moleküls stattfindet, das auch die biologische Wirkung auslöst. Kommt es bei der Energieabsorption im Gewebe zur Bildung diffusibler Radikale, spricht man von indirekter Strahlenwirkung, da erst über Radikalkettenreaktionen Schäden im kritischen Zielmolekül ausgelöst werden

(Herrmann, Baumann und Dörr, 2006). Insbesondere der Radiolyse des Wasser und der damit verbundenen Entstehung von Ionen, Radikalen und Peroxiden kommt hierbei eine besondere Rolle zu, da eine Zelle zu ca. 80% aus Wasser besteht (Roots und Okada, 1975). Die indirekte Strahlenwirkung wird außerdem durch Sauerstoff erhöht, da er die Peroxidbildung begünstigt (Gray *et al.*, 1953). So gebildete Hydroxyl-Peroxyl-Radikale haben aufgrund ihres vergleichsweise trägen Reaktionsverhaltens einen größeren Wirkungsradius. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, auch "entferntere" Zielmoleküle zu erreichen und zu schädigen (Herrmann, Baumann und Dörr, 2006).

Powell und McMillan unterschieden als Strahlenschäden an der DNA Basen- und Zuckerschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen (Powell und McMillan, 1990). Zellen besitzen jedoch die Fähigkeit, derartige Schäden zu beheben. Zur Erkennung und Reparatur der unterschiedlichen Schäden sind viele Mechanismen beschrieben (Kanaar, Hoeijmakers und van Gent, 1998; Karran, 2000; Wannenmacher, Debus und Wenz, 2006). Ist der Schaden zu groß, greifen sie nicht mehr und der Zelltod tritt ein (Olive, 1998). Strahlenbiologisch ist hierbei der sog. klonogene oder reproduktive Zelltod von Interesse. Verlieren die Zellen ihre Fähigkeit sich zu teilen und Kolonien von mindestens 50 Zellen zu bilden, gelten sie als klonogen tot. Ursächlich sind drei, sich teils überlappende Mechanismen:

1. Mitosetod: Aufgrund von Chromosomenaberrationen und/oder Genmaterialverlust kommt es zur Teilungsunfähigkeit nach wenigen Mitosen.
2. Interphasetod: Aktivierung eines Apoptoseprogramms und Zelluntergang vor weiteren Teilungsprozessen.
3. Differenzierung: Zelldifferenzierung zur terminalen Funktionszelle wird induziert oder beschleunigt, hiermit verliert die Zelle ihre Klonogenität.

1.3.2. Klonogenes Überleben

Das klonogene Überleben ist abhängig von der Zellart, bzw. der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit, dem Zellzyklus, der applizierten Dosis und deren Aufteilung (Fraktionierung) und Verlängerung sowie dem sog. linearen Energietransfer (LET) der Strahlung (Herrmann, Baumann und Dörr, 2006). Das linear-quadratische Modell kann zur näheren Beschreibung dieser Zusammenhänge bei niedrigen Bestrahlungsdosen herangezogen (Rossi und Kellerer, 1972; Gilbert, Hendry und Major, 1980) und anhand von Zellüberlebenskurven dargestellt werden (Puck und Marcus, 1956):

$$\ln SF = -\alpha D - \beta D^2$$

Formel 2: Linear-quadratisches Modell

Es wird angenommen, dass die lineare Komponente durch den direkten DNA-Schaden, den ein Teilchen bedingt, verursacht wird, d.h. es findet sich ein linearer Zusammenhang zwischen Schaden und Dosis (Fowler, 1989). Die "Schulter" der Kurve, also der quadratische Teil, ist die Summe zweier unabhängig voneinander, durch zwei Teilchen verursachter Schäden, die für sich genommen nicht lethal (sog. sublethale Schäden) gewesen wären. Steigt die Dosis, steigt linear die Wahrscheinlichkeit, dass sublethale Schäden auftreten, und damit ist die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der Dosis (Herrmann, Baumann und Dörr, 2006).

1.4. Invasion von Tumorzellen

Destruktives und infiltratives Wachstum in umliegendes Gewebe (sog. Invasion) und die Fähigkeit Tochtergeschwülste zu bilden - zu metastasieren - sind sog. Malignitätskriterien eines Tumors. Zur Metastasenbildung müssen sich die Krebszellen von ihrem Primärtumor lösen, die Basalmembran überwinden und umliegendes Bindegewebe durchqueren um Anschluss an Lymph- und/oder Blutgefäße zu erhalten. Die genauen Mechanismen dieses Vorgangs sind Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht abschließend verstanden. Eng mit diesem Prozess verbunden scheint die sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT).

1.4.1. Epitheliale-mesenchymale Transition - EMT

EMT bezeichnet einen Wandlungsprozess differenzierter polarer Epithelzellen, der ursprünglich für embryonale Entwicklungsprozesse beschrieben wurde (Hay, 1995). Durch verschiedene biochemische Vorgänge erlangen Epithelzellen einen mesenchymalen Phänotyp. Hiermit verbunden sind neben erhöhter Apoptoseresistenz auch verbesserte Migrationseigenschaften, da sich die Zell-Zell-Adhäsion verändert, und eine gesteigerte Invasivität (Kalluri und Neilson, 2003). Genau genommen handelt es sich hierbei nicht um eine Transformation, wie von Hay beschrieben (Hay, 1995), sondern eine Art Übergangszustand, da dieser Vorgang sowohl reversibel ist (mesenchymale-epitheliale Transition, MET) als auch von der neoplastischen Transformation unterschieden werden muss (Kalluri und Neilson, 2003).

Mit dem epithelialen Phänotyp sind verschiedene Marker wie E-Cadherin, Cytokeratin und Laminin I assoziiert, während den mesenchymalen Phänotyp N-Cadherin, Vimentin, Snail, Slug und Fibronectin charakterisieren (Thiery, 2003; Kalluri und Weinberg, 2009). Kalluri et al. und Zeisberg et al. unterscheiden 3 Typen von EMT (Kalluri und Weinberg, 2009; Zeisberg und Neilson, 2009). EMT Typ 1 findet sich

Einleitung

physiologisch während spezieller Stufen der Embryogenese, wie beispielsweise der Einnistung des Embryos, und der frühen Organentwicklung (Lee *et al.*, 2006). Auch im Zusammenhang mit Geweberegeneration, Entzündungsprozessen und Fibrose verschiedener Organe (Typ 2 EMT) wurde eine EMT beschrieben (Kim *et al.*, 2006; E. M. Zeisberg *et al.*, 2007; M. Zeisberg *et al.*, 2007). Für diese Arbeit war hingegen Typ 3 EMT von Interesse, der von Thiery als kritischer Schritt hin zum invasiven Verhalten epithelialer Krebszellen vorgeschlagen wurde (Thiery, 2002). Wie in Abbildung 2 dargestellt, kommt es nach Entartung der Epithelzellen zum Überwinden der Basalmembran, dem Eintritt ins Gefäßsystem und nach erneutem Überwinden des Gefäßendothels zur Transition und Metastasenbildung.

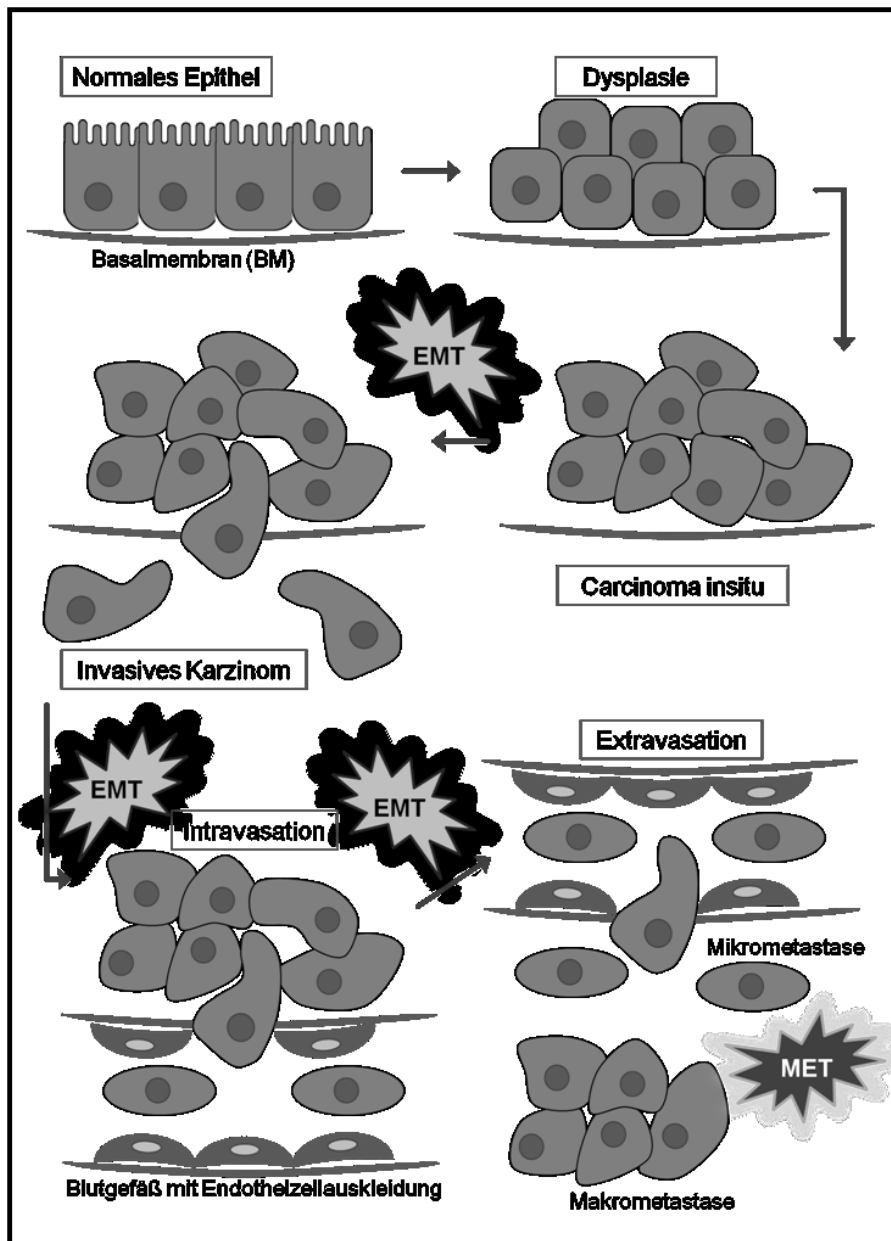


Abbildung 2: Vorkommen von EMT und MET bei der Entstehung und Progression von Karzinomen.

Modifiziert nach Thiery: *Sites of EMT and MET in the emergence and progression of carcinoma*. In: *Nat. Rev.* 2002.

Nicht abschließend geklärt ist der Zeitpunkt der EMT in Tumorzellen innerhalb der Metastasierungskaskade. Während die Beobachtung, dass EMT-assoziierte Gene in Zellen an der Tumorinvasionsfront zu finden sind (Brabletz *et al.*, 2005; Gavert *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006), nahe legt, dass EMT bei der Überwindung der Basalmembran eine wichtige Rolle zukommt, ist auch ein Zusammenhang mit Eindringen und Verlassen des Gefäßsystems beschrieben (Grünert, Jechlinger und Beug, 2003; Yang *et al.*, 2004).

Was die auslösenden Faktoren für EMT in Tumorzellen darstellt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Es wird angenommen, dass Röntgenstrahlung bestimmte zelluläre und molekulare Vorgänge in der Mikroumgebung induziert und dadurch EMT bedingen könnte. Nach Transplantation von Tumorgewebe in vorbestrahltes Brustgewebe zeigten die Tumoren weniger Angiogenese, höhere Hypoxielevel und gesteigerte Invasivität sowie eine vermehrte Anzahl an Metastasen als Tumoren in einem nicht bestrahlten Gewebebett (Kuonen *et al.*, 2012). Eine Beteiligung des SCF/c-Kit-Signalweg wird diskutiert, denn es konnte gezeigt werden, dass es aufgrund gesteigerter SCF-Sekretion durch hypoxische Tumorzellen zu einer deutlichen Mobilisierung c-Kit-positiver Myeloidzellen des Knochenmarks kommt, die wiederum die Metastasierung des Primarius und bereits bestehender Metastasen fördern (Kuonen *et al.*, 2012).

Zu untersuchen, ob Bestrahlung auch direkt an Tumorzellen über eine Aktivierung des SCF/c-Kit-Signalweges Einfluss auf das Invasionsverhalten nimmt, ist Teil dieser Arbeit.

1.4.1.1. EMT-assozierte Marker

Nach Kalluri und Weinberg zählen E-Cadherin, Cytokeratin und Laminin zu den mit dem epithelialen Phänotyp assoziierten Markern (Kalluri und Weinberg, 2009). Der mesenchymale Phänotyp ist durch N-Cadherin, Vimentin, Snail, Slug und Fibronectin charakterisiert (Thiery, 2003; Kalluri und Weinberg, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien auf ihre Expression von N- und E-Cadherin sowie Vimentin hin untersucht.

E- und N-Cadherin werden den Typ-I-Cadherinen zugeordnet. Es handelt sich dabei um transmembrane, kalziumabhängige Adhäsionsmoleküle. Sie sind an der Aufrechterhaltung der epithelialen Struktur verschiedener Gewebe beteiligt. Des Weiteren sind sie während der embryonalen Entwicklung von Bedeutung (Wheelock, Knudsen und Johnson, 1996). Während E-Cadherin, E von endothelial oder auch embryonal, hierbei vor allem für den Zellverbund von epitheliale Gewebe verantwortlich ist (Gumbiner *et al.*, 1996), findet sich N-Cadherin vor allem in Neuronen, mesothelialen Zellen, Fibroblasten, Muskel- und Linsengewebe (Islam *et al.*, 1996). In malignen Tumoren kommt den Cadherinen eine Kontrollfunktion des Invasionsverhaltens der Zellen zu. Hierbei fungiert E-Cadherin als Invasionssuppressor und ist daher in vielen Karzinomen herabreguliert. N-Cadherin hingegen fördert das Invasionsverhalten (Derycke und Bracke, 2004). In epithelialen Zellen führt eine Transfektion mit N-Cadherin zu einer veränderten Zellmorphologie und gesteigerten Beweglichkeit (Islam *et al.*, 1996; Hazan *et al.*, 1997).

Vimentin zählt zu den zytoplasmatischen Intermediärfilamenten vom Typ III und wird vor allem in Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert (Franke, Hergt und Grund, 1987). Es ist hier an der Regulation der zellulären Mechanik beteiligt und nimmt Einfluss auf die Zellform und -beweglichkeit, sowie Anordnung der Zellorganelle (Guo *et al.*, 2013). So konnte nach Ausschaltung von Vimentin in sog. Knockout-Mäusen unter verschiedenen Stressmodellen neben einer verzögerten Wundheilung (Eckes *et al.*, 2000) auch eine gestörte Modulation des Gefäßtonus (Terzi *et al.*, 1997), eine Abschwächung der arteriellen Gefäßdilatation (Henrion *et al.*, 1997) und Beeinträchtigungen der Migrationsfähigkeit verschiedener Blutzellen (Nieminen *et al.*, 2006) beobachtet werden.

1.5. 2D- und 3D-Zellkultur

Jedes Gewebe und Organ besitzt eine dreidimensionale Struktur. Zellen zeigen verschiedene Morphologien, wie beispielsweise polarisierte Epithelzellen, und sind über unterschiedliche Zell-Zell-Kontakte miteinander verknüpft (Alberts *et al.*, 2005). Diese Kontakte erfüllen jedoch nicht nur einen mechanischen Zweck, sondern dienen unter anderem der Kommunikation. Grundlegende zelluläre Vorgänge wie Differenzierung, Apoptose, Proliferation oder Invasion werden jedoch nicht nur über die Interaktion mit direkten Nachbarzellen gesteuert, sondern auch durch die umgebende sog. extrazelluläre Matrix (EZM) (Roskelley, Desprez und Bissell, 1994; Barros *et al.*, 1995; Le Beyec *et al.*, 2007; Lelièvre, 2009). Sogar das Ansprechen von gezielten Therapien wird durch die EZM beeinflusst (Kenny, 2007; Weigelt *et al.*, 2010). Bei der EZM handelt es sich um eine komplexe dreidimensionale Struktur aus diversen, abhängig von Mikromilieu und Gewebe variierenden Makromolekülen: Kollagen, Laminin, Fibronectin, Proteoglykane und Hyalurone (Yurchenco, Cheng und Colognato, 1992; Aumailley *et al.*, 1993; Erickson und Couchman, 2000; Ghajar und Bissell, 2008; Bowers, Banerjee und Baudino, 2010). Die EZM bildet auch die Basalmembran (BM). Sie findet sich am basalen Pol von Epithelzellen, die einen Teil davon, die Basallamina bestehend aus Lamina rara externa und Lamina densa, bilden. Die dritte Schicht, die sog. Lamina fibroreticularis, dient der Verankerung im angrenzenden Bindegewebe (Welsch, Kummer und Deller, 2006). Neben ihrer Funktion als mechanische Barriere beeinflusst sie Zellform und -wachstum, Migration und Genexpression der Epithelzellen (Hagios, Lochter und Bissell, 1998; Ghajar und Bissell, 2008; Simons und Mlodzik, 2008). Während in der BM Kollagen Typ IV das bestimmende Strukturprotein darstellt, findet sich in der EZM Typ I Kollagen, was der EZM die Bildung einer 3-dimensionalen Matrix ermöglicht (Lodish, 2000; Rowe und

Weiss, 2009). Wie bereits erwähnt, sind Epithelzellen an der Bildung der EZM beteiligt (Simon-Assmann *et al.*, 1995; Powell *et al.*, 2005). Daneben finden sich jedoch noch zahlreiche weitere Zelltypen wie Stromazellen, Fibroblasten und Osteoblasten (Kim, Turnbull und Guimond, 2011). Die Kontaktstelle zwischen Zelle und EZM bilden Adhäsionsmoleküle (Schwartz, 2001; Hynes, 2002). Zu diesen an der Zelloberfläche befindlichen Molekülen zählen (unter anderen) Cadherine, Selektine, die Immunglobulin-Superfamilie und Integrine (Alberts *et al.*, 2005). Sie bilden die Basis zahlreicher Wechselwirkungen zwischen Zellinnerem und der Umgebung und regulieren so essentielle zelluläre Vorgänge wie Differenzierung, Proliferation und Überleben (Giancotti und Ruoslahti, 1999; Hynes, 2002). Integrine sind hierbei, da sie aufgrund ihrer molekularen Struktur keine Kinaseaktivität besitzen, auf Adaptionsproteine angewiesen, mit denen sie sogenannte fokale Adhäsionen (FA), bilden (Van der Flier und Sonnenberg, 2001). Diese Multiproteinkomplexe stehen ebenfalls in Verbindung mit Teilen des Zytoskeletts und damit in Wechselwirkung mit der nukleären Matrix (Zhang *et al.*, 2001; Berrier und Yamada, 2007; Xu, Boudreau und Bissell, 2009), wodurch unter anderem die Genexpression reguliert werden kann (Nelson und Bissell, 2006; Xu, Boudreau und Bissell, 2009).

Um eine möglichst genaue *in vivo* EZM zu simulieren, wurde intensiv an der Etablierung dreidimensionaler, gewebeähnlicher Methoden gearbeitet. Verschiedene 3D-Zellkulturmodelle zeigten im Vergleich mit 2D-Zell-Monolayer-Kulturen auffällige Unterschiede der untersuchten Zellen in Morphologie, Gen- und Proteinexpression, Überleben, Proliferation, Differenzierung und Metabolismus (Roskelley, Desprez und Bissell, 1994; Le Beyec *et al.*, 2007; Lelièvre, 2009).

Mithilfe von 3D-Zellkulturmodellen können demnach *in vivo* Vorgänge realistischer abgebildet werden, da den Zellen die Möglichkeit zu viel komplexeren Interaktionen gegeben wird.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit sämtliche Versuche unter 3D-Kulturbedingungen mit lamininreicher EZM (lrEZM), durchgeführt. Da für H23 und H226 noch keine Daten bezüglich unterschiedlicher Zellkulturbedingungen vorliegen und um Unterschiede zu 2D-Bedingungen zu detektieren, wurden alle Experimente auch in Monolayer-Kultur durchgeführt um vergleichende Beobachtungen anstellen zu können.

2. Zielsetzung und Fragestellung

Lungenkrebs zählt weltweit zur führenden Krebstodesursache mit einer schlechten Prognose. Bei der Therapie des Nichtkleinzelligen-Lungenkarzinoms (NSCLC) kommt neben der chirurgische Tumoresektion der Strahlentherapie eine bedeutende Rolle zu (Goeckenjan *et al.*, 2011). Ziel ist hierbei stets die lokale Tumorkontrolle unter Schonung des Normalgewebes. Des Weiteren ist das Patientenüberleben maßgeblich von der Metastasierung des Tumors abhängig. Es ist bekannt, dass der SCF/c-Kit-Signalweg häufig in Tumoren überexprimiert ist und Tumorentstehung, Proliferation, Migration sowie die Therapieresistenz beeinflusst und viele Tumoren mit hohen Leveln an SCF/c-Kit eine schlechte Prognose zeigten (Yasuda *et al.*, 2006, 2007; Marech, Gadaleta und Ranieri, 2014; Wang *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2015). Der SCF/c-Kit-Signalweg wird in einigen Tumorzellen als ausschlaggebend für eine Strahlenresistenzentwicklung gesehen und damit als Einflussgröße des klonogenen Überlebens. Auch wurde seine wichtige Rolle für das Invasionsverhalten von Tumorzellen als erster Schritt der Metastasierung gezeigt.

Ziel dieser Arbeit war es, durch einen möglichen Einfluss des SCF/c-Kit-Signalweges auf die Strahlenempfindlichkeit von NSCLC-Zellen und deren Invasionsverhalten neue Ansatzpunkte für eine Optimierung der Therapie von NSCLC-Tumoren aufzuzeigen. Konkret ergaben sich daher folgende Fragen:

- Beeinflusst der SCF/c-Kit-Signalweg die Strahlenempfindlichkeit von NSCLC-Zellen?
- Eignet sich der SCF/c-Kit-Signalweg daher als Biomarker für die Ausbildung einer Strahlenresistenz?
- Welchen Einfluss hat der SCF/c-Kit-Signalweg auf das Invasionsverhalten von NSCLC-Zellen?
- Inwiefern beeinflusst Photonenstrahlung das Invasionsverhalten?

Grundlegende zelluläre Vorgänge wie Differenzierung, Apoptose, Proliferation oder Invasion werden auch durch die umgebende sog. extrazelluläre Matrix (EZM) beeinflusst (Roskelley, Desprez und Bissell, 1994; Barros *et al.*, 1995; Le Beyec *et al.*, 2007; Lelièvre, 2009). 3D-Kulturen ermöglichen daher physiologischere und *in vivo*-Modellen ähnliche Bedingungen. Daher wurde auch der Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen auf NSCLCs im Hinblick auf oben genannte Fragen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Gerät/ Bezeichnung	Modell	Hersteller
Absaugpumpe	Vacusafe Comfort	Integra Biosciences, Zizers, CH
Absorbance Mikroplatten Reader (Proteinmessung)	Elx 808	BioTek, Winooski, USA
Autoklav	Model UFE 600	Memmert, Schwabach, D
Bioanalyzer	2100	Agilent Tech., Palo Alto, CA, US
Densitometrie Absorptionsreader	ELX 808	BioTEK Instruments GmbH, Bad-Friedrichshall, D
Einfrierbox	Mister Frosty	Thermo-Scientific, Schwerte, D
Eismaschine	F 100 Compact	Icematic, Meerbusch, D
Entwicklungsmaschine	Curix 60	Siemens, Erlangen, D
GenePix Scanner	4100A	Axon Instr., Downingtown, PA, US
Gefrierschrank -20 °C	KGN34A10	Bosch, Stuttgart, D
Gefrierschrank -80 °C	HERAfreeze Top	Thermo-Scientific, Schwerte, D
Heizrührer	MR 3002	Heidolph, Schwabach, D
Inkubator	HERAcell	Thermo-Scientific, Schwerte, D
Kryobehälter	Arpege 110	VWR International, Darmstadt, D
Kühlschrank +4 °C	KGN34A11	Bosch, Stuttgart, D
Kühlzentrifuge	5430 R	Eppendorf, Hamburg, D
Magnetrührer	MR 1000	Heidolph, Schwabach, D
Mikroskop	DM IL LED	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, D
Nano Drop® Spektrometer	ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
PCR-Gerät	7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Foster City, CA, US
pH-Elektrode	N-61	Schott, Mainz, D
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin, D
Pipetierhilfe	PIPETBOY acu	Integra Biosciences, Zizers, CH
Pipette 0,2-2 µl	Pipetman Neo P2	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pipette 100-1000 µl	Pipetman Neo P1000	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pipette 10-100 µl	Pipetman Neo P100	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F

Material und Methoden

Pipette 1-10 µl	Pipetman Neo P10	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pipette 20-200 µl	Pipetman Neo P200	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Pipette 2-20 µl	Pipetman Neo P20	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Präzisionswaage	Typ AE 240/9	Mettler-Toledo, Gießen, D
Rollschüttler	SRT1	Stuart Scientific, Stone, UK
Sterilbank	Cellguard, N440	Integra Biosciences, Zizers, CH
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, D
Thermocycler	PCR System 2400	Gene Amp, Foster City, CA, US
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	Mikro 22R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Vortexer	Agitateur Top-Mix 11118	Bioblock Scientific, Schwerte, D
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Water Purification System	Millipore, Eschborn, D
Wasserbad	MW-Z	Julabo Labortechnik, Seelbach, D
Zentrifuge	Mikro 200 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D

Tabelle 1: Verwendete Geräte

3.1.2. Hilfs- und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Alu Rack	Roth, Karlsruhe, D
Amersham Hyperfilm ECL	Amersham, Buckinghamshire, GB
Bottle-top Filter, Gewinde 33 mm, 45 mm	Millipore Carrigtwohill, Co., IRL
Cronex 5, 18x24, 100 NIF, Medical X-Ray Film	AGFA
Deckel für Reaktionsgefäße 0,2 ml gewölbt	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D
Deckgläschen 21 x 26 mm	Gerhard Menzel, Braunschweig, D
Diamond Filtertips sterile 0,1-10 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Diamond Filtertips sterile 100-1000 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Diamond Filtertips sterile 10-100 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Diamond Filtertips sterile 20-200 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Diamond Filtertips sterile 2-30 µl	Gilson S.A.S, Villiers le Bel, F
Falcons 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 0,5-10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 0-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 0-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 0-200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterspitze PP natur 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D

Blottingpaper (Whatmann®-Paper)	GE Healthcare, Solingen, D
Handschuhe, Microtouch Nitra-TEX, S	Ansell Healthcare, Brüssel, B
Handschuhe, Microtouch Nitra-TEX, M	Ansell Healthcare, Brüssel, B
Hypercassette™	Amersham, Buckinghamshire, GB
Hyper™ ECL-Filme	Amersham, Freiburg, D
Kryoboxen	Roth, Karlsruhe, D
Mikro-Röhren, 2 ml, Typ I mit Stehrand	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikrotestplatten, 96er, gerader Boden	Sarstedt, Nümbrecht, D
Neubauer-Kammer	Brand, Wertheim, D
PCR Workstation	Roth, Karlsruhe, D
PCR-Einzelgefäße, 0,5 ml 2000per VE	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR-Racks	Roth, Karlsruhe, D
PVDF Hybond P 20*20 cm	Amersham, Buckinghamshire, GB
Rastereinsatz	Roth, Karlsruhe, D
Reaktionsgefäße, pp, Natur, 0,2 ml Streifen, ohne Deckel	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D
Rotilab PCR-Racks	Roth, Karlsruhe, D
Rotilab-Eiswanne	Roth, Karlsruhe, D
Safe-lock Tubes, farblos, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Safe-lock Tubes, farblos, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Superplate PCR Detectionplate	Thermo-Scientific, Bonn, D
T12,5 Zellkulturflasche mit Gasaustauschkappe	Sarstedt, Nümbrecht, D
T25 Zellkulturflasche mit Gasaustauschkappe	BD, Heidelberg, D
T75 Zellkulturflasche mit Gasaustauschkappe	Sarstedt, Nümbrecht, D

Tabelle 2: Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

3.1.3. Lösungen und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
3-D Culture Matrix	Trevigen, Gaithersburg, MD, USA
Agarose Type I-A	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua Ecotainer®	B.Braun, Melsungen, D

Material und Methoden

Aqua, <i>RNase</i> -, <i>DNase</i> -free	Gibco, Qiagen GmbH, Hilden, D
Aqua Stabil	Julabo Labortechnik, Seelbach, D
BSA (Bovines Serum Albumin)	PAA Laboratories, Pasching, AUT
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, D
DMEM-(<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) Medium, High Glucose mit Glutamax	PAA Laboratories, Pasching, AUT
DMSO (<i>Dimethyl sulfoxide</i> $\geq 99,5\%$)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTP Mix 10 mM	Fermentas, Bonn, D
DPBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)	PAN-Biotech, Aidenbach, D
ECL-Plus-Kit	GE Healthcare, Solingen, D
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol > 99,5% reinst	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol 70% vergällt	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Glycin > 99%	Roth, Karlsruhe, D
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe, D
Laminin-reiche Extrazelluläre Matrix (BD Matrigel™)	BD Biosciences, San José, CA, USA
MEM <i>Non-essential Amino Acid Solution</i>	Invitrogen™, Darmstadt, D
Oligo(dT)18 primer	Fermentas, Bonn, D
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, GlutaMAX™	Gibco®, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech, Aidenbach, D

Material und Methoden

peqGold TriFast	PEQLAB Biotech., Erlangen, D
Pierce® Protein Assay Kit	Thermo-Scientific, Bonn, D
Reaction Buffer (bei Oligo(dT)18 primer)	Fermentas, Bonn, D
RevertAid™ <i>Reverse Transcriptase</i>	Fermentas, Bonn, D
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, Bonn, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe, D
RPMI 1640 m. L-Glutamin	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Schwefelsäure 1 mol/l	Roth, Karlsruhe, D
SDS (<i>Sodium Dodecylsulfate</i>) solution	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, D
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo-Scientific, Bonn, D
Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo-Scientific, Bonn, D
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Trypsin 0,5%/EDTA 0,2%	PAN-Biotech, Aidenbach, D
2-Propanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 3: Verwendete Substanzen und Lösungen

3.1.4. Gebrauchslösungen und Gele

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
5%-iges Sammelgel	5,7 ml ddH ₂ O	
	1,7 ml Gel 30	Roth, Karlsruhe, D
	2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	100 µl 10% w/v SDS	Roth, Karlsruhe, D
	5 µl TEMED	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	100 µl APS (10%)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
8%-iges Trenngel	7 ml ddH ₂ O	
	2,7 ml Gel 30	Roth, Karlsruhe, D
	2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	5 µl TEMED	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	100 µl 10% w/v SDS	Roth, Karlsruhe, D
	100 µl APS (10%)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Agarose-Gel	2 µl SYBR Safe	Invitrogen™, Darmstadt, D
	0,8 g Agarose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	100 ml 1xTEA-Puffer	

Tabelle 4: Zusammensetzung verwendeter Gele

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Blockingpuffer	Waschpuffer	
	5% <i>skim milk powder</i>	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Probenpuffer (10x)	0,3% Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, D
	625 mM Tris (pH 6,8)	Roth, Karlsruhe, D
	20% SDS	Roth, Karlsruhe, D
	50% Glycerol	Merck, Darmstadt, D
	9% Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, D
RIPA (radioimmuno- precipitation- assay)- Lysepuffer	1 ml RIPA- Stammlösung	
	40 µl COMPLETE™ (Proteaseinhibitor)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
	5 µl Na- Orthovanadat (200 mM) (Proteaseinhibitor)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
	4 µl Na- Fluorid (500 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Strippingpuffer	5 ml 1 M Glycin	Roth, Karlsruhe, D
	5 ml ddH ₂ O	
	500 µl rauchende HCl	Merck, Darmstadt, D

Material und Methoden

TBS (Tris-buffered saline)-Puffer (10x)	24,2 g Tris ad 1 l ddH ₂ O (pH = 7,6)	Roth, Karlsruhe, D
	80 g NaCl	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
TEA-Puffer (10x)	1 mM EDTA-Na ₂ -Salz	Merck, Darmstadt, D
	40 mM Tris	Roth, Karlsruhe, D
	1% Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Transferpuffer	14,4 g Glycin ad 800 ml H ₂ O	Roth, Karlsruhe, D
	200 ml Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	3,2 g Tris	Roth, Karlsruhe, D
	10 ml 10% (w/v) SDS	Roth, Karlsruhe, D
Waschpuffer	100 ml 10x TBS	
	0,05% Tween20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

Tabelle 5: Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
cDNA-Mastermix	4 µl 5x Reaction Buffer	Fermentas, Bonn, D
	0,5 µl RiboLock	Fermentas, Bonn, D
	2 µl dNTP Mix	Fermentas, Bonn, D
	1 µl Reverse Transkriptase (je Probe)	Fermentas, Bonn, D
ECL-Lösung (pro Membran)	2,0 ml Solution A (0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) 0,05 g Luminol)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	200 µl Solution B (0,011 g <i>p</i> -Cumarsäure 10 ml DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	1 µl Solution C (30% H ₂ O ₂)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Kryomedium	RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach, D
	10% FCS	PAN-Biotech, Aidenbach, D
	5% DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kulturmedium	RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach, D
	10% FCS	PAN-Biotech, Aidenbach, D
	1% P/S	PAN-Biotech, Aidenbach, D

Material und Methoden

PCR-Mastermix	12,5 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen™, Darmstadt, D
	1 µl MgCl ₂	Invitrogen™, Darmstadt, D
	9,5 µl H ₂ O (<i>RNase-</i> , <i>DNase-free</i>)	Gibco, Qiagen GmbH, Hilden, D
	1 µl Primergebrauchslösung	
Primergebrauchslösung	80 µl H ₂ O	Gibco, Qiagen GmbH, Hilden, D
	10 µl forward Primer	biomers GmbH, Ulm, D
	10 µl reverse Primer	biomers GmbH, Ulm, D
RIPA-Stammlösung	2,5 ml Tris-HCl (pH 7,4; 1 M)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	0,5 ml NP-40	Thermo-Scientific, Bonn, D
	1,25 ml <i>Sodium deoxycholat</i> (10%)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	1,5 ml NaCl (5 M)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
	0,1 ml EDTA (0,5 M)	Roth, Karlsruhe, D
	44,15 ml ddH ₂ O	
SDS-PAGE (10x)	188 g Glycin ad 900 ml H ₂ O	Roth, Karlsruhe, D
	30 g Tris	Roth, Karlsruhe, D
	100 ml SDS 20%	Roth, Karlsruhe, D
Transfektionsgemisch	4 µl siRNA	biomers GmbH, Ulm, D
	4 µl Lipofectamin™ 2000	Invitrogen™, Darmstadt, D
	500 µl Opti-MEM®	Gibco®, Darmstadt, D
Transfektionsmedium	50% RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach, D
	50% Opti-MEM®	Gibco®, Darmstadt, D

Tabelle 6: Zusammensetzung verwendeter Lösungen

3.1.5. Computerprogramme

Bezeichnung	Hersteller
Citavi	Swiss Academic Software, CH
Gen5™	BioTek, Winooski, US
GenePix Pro 5.0	Axon Instr., Downingtown, PA, US
Graph Pad Prism	Graph Pad Software Inc., San Diego, US
Image Lab	Bio-Rad Laboratories, München, D
Mendeley Ltd.	Elsevier, Amsterdam, NL
Microsoft Excel 2007	Microsoft Corp., Redmond, WA, US
SDS 2.3	Applied Biosystems®, Foster City, CA, US

Tabelle 7: Verwendete Computerprogramme

3.2. Zellkultur

3.2.1. Zelllinien

Für die Durchführung der Experimente wurden die humanen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien H23 (ATCC® (*American type culture collection*)-NR.: CRL-5800™) und H226 (ATCC®- NR.: CRL-5826™) verwendet. Bei H23 handelt es sich um Adenokarzinomzellen, welche eine Mutation im p53 Gen aufweisen (Takahashi *et al.*, 1989). Hingegen werden Zellen der Zelllinie H226 dem Plattenepithelkarzinom und Mesotheliom zugeordnet (Phelps *et al.*, 1996).

Des Weiteren wurden aus humanen Umbilikalvenen gewonnene Endothelzellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)*) verwendet. Diese waren bereits in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe nach Jaffe *et al.* isoliert und passagiert worden (Jaffe *et al.*, 1973; Kamlah *et al.*, 2011).

3.2.2. Kultivierung

Die Arbeit mit Zellkulturen fand stets unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Werkbank statt. Sämtliche dafür verwendeten Lösungen und Substanzen wurden jeweils vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Gewährleistet wurden optimale Wachstumsbedingungen durch Inkubation und Kultivierung der Zellen in einem 37 °C warmen, mit 5% CO₂-begasten Brutschrank bei 95% Luftfeuchtigkeit. Regelmäßig wurden pH-Wert des Nährmediums und Wachstumsdichte der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert.

Die verwendeten Zelllinien wurden in T75-Flaschen mit 10 ml RPMI-1640-Nährmedium, angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), kultiviert. Eine

Passagierung fand bei einer Zellkonfluenz von ca. 80% statt. Hierfür wurde unter der Sterilbank das vorhandene Medium abgesaugt, die Zellen zweimalig mit DPBS-Puffer gewaschen und anschließend durch Aufbringen 1% -Trypsinlösung der Zellrasen vom Flaschenboden gelöst. Nach Zugabe von 1 ml FCS konnte die Suspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und 10 µl zur Zellzahlermittlung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer entnommen werden. Nach Verdünnen der Suspension auf 1 ml Medium/ 600.000 Zellen, wurden ca. 600.000 Zellen in 10 ml Medium pro T-75-Flaschen ausgesät.

3.2.2.1. Langfristige Konservierung

Die langfristige Konservierung der Zellen erfolgte als Gefrierkultur bei -190 °C in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben gewaschen, gelöst und nach Überführung mit FCS in ein 50 ml Röhrchen bei 248 g für 10 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des flüssigen Überstands wurde das Zellpellet nach kurzer Kühlung auf Eis gründlich in Kryomedium (vgl. Tabelle 6) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipetiert. Eine schrittweise und damit schonende Abkühlung um 1 °C/ Minute wurde durch ein Kryo-Einfriergerät erreicht und die Zellen nach 24 h Lagerung bei -80 °C in flüssigem Stickstoff (-190 °C) konserviert.

Zur erneuten Kultivierung der gelagerten Zellen konnten die benötigten Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad zügig aufgetaut und durch Zugabe warmen Mediums (37 °C) in Kulturflaschen ausgesät werden. Um eine Zellschädigung durch das enthaltene DMSO zu minimieren, wurde nach 24 h ein Wechsel des Mediums durchgeführt.

3.2.3. 2D- und 3D-Kultur

Eine Kultivierung unter 2D-Bedingungen entspricht in dieser Arbeit den normalen Konditionen einer Monolayer-Kultur, bei der die Zellen als planer adhärenter Zellrasen in Kulturflaschen oder -schalen mit Medium wuchsen.

Hingegen wurden die Zellen für die 3D-Kultivierung vor Experimentbeginn, jedoch erst 24 h nach Transfektion, in Agarose (1%)-beschichtete Loch-Platten mit einer 10%-igen laminin-reichen extrazellulären Matrix ausgesät. Nach 2 h Ruhezeit im Brutschrank wurde jeder Probe Medium zur optimalen Nährstoffversorgung zugegeben. Bei kleiner Lochgröße (96-Loch-Platten), wurde zum Schutz vor Verdunstung DPBS-Puffer in die umliegenden Vertiefungen pipetiert.

3.2.4. Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer Zählkammer

Hierfür wurden 10 µl einer Zell-Medium-Suspension vorsichtig an den Rand einer sog. Neubauer-Zählkammer pipetiert und die 4 Großquadrate unter dem Mikroskop

ausgezählt. Mit folgender Formel konnte dann die Zelldichte der Suspension bestimmt werden:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{gezählte Zellen/Zahl der Großquadrate}) \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}(\text{Zellsuspension})$$

Formel 3: Zelldichtebestimmung

Entsprechend der benötigten Zelldichten, bzw. Zellzahlen konnte die Suspension nun weiter verdünnt oder mittels Zentrifugation (10 min bei 248 g) und erneutem Lösen in Medium konzentriert werden.

3.3. Versuchsaufbau

Grundsätzlich wurden unter zwei verschiedenen Kulturbedingungen (2D und 3D) drei unabhängige Gruppen (sicontrol, siSCF und nativ) gebildet, um den Einfluss einer SCF-Inhibition in den ausgewählten Zelllinien mit und ohne Bestrahlung vergleichen zu können.

a. 2D: die Zellen wurden als planer adhärenter Zellrasen in Kulturflaschen kultiviert, transfiziert und bestrahlt.

b. 3D: Um ein dreidimensionales Wachstum zu erreichen, wurden die Zellen nach Transfektion in 0.5 mg/ml laminin-reiche extrazelluläre Matrix eingebettet.

1. sicontrol (ctr): Die Kontrollgruppe wurde mittels ungerichteter siRNA behandelt, so dass es zu keiner Beeinflussung der Gene in den Zellen kam, sie jedoch ebenfalls den Transfektionsbedingungen ausgesetzt waren.

2. siSCF (SCF): in der Versuchsgruppe wurden die Zellen mittels gegen SCF gerichteter siRNA transfiziert und somit SCF inhibiert.

3. nativ: Zum weiteren Vergleich einer Transfektionswirkung wurden alle Experimente auch mit unbehandelten, also nicht transfizierten Zellen durchgeführt.

In einem ersten Experiment wurden diese 6 Untergruppen mittels Koloniebildungstest auf ihr klonogenes Überleben hin untersucht. Die Bestrahlung erfolgte mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy. In einem zweiten Experiment galt es, Invasionsverhalten nach 24 h anhand eines Invasionstestes ohne und mit Bestrahlung (0 und 6 Gy) darzustellen. Zur Probengewinnung für RNA- und Proteinisolation wurden die Gruppen mit 0, 2 und 6 Gy bestrahlt und 24 h später analysiert.

	keine Bestrahlung			Bestrahlung		
2D	nativ	sicontrol	siSCF	nativ	sicontrol	siSCF
3D	nativ	sicontrol	siSCF	nativ	sicontrol	siSCF

Tabelle 8: Versuchsgruppen

Alle Experimente wurden in sämtlichen Gruppen mindestens drei mal unabhängig voneinander durchgeführt ($n \geq 3$).

3.4. Transiente Transfektion

Die erwünschte SCF-Inhibition wurde durch small interfering RNA (siRNA) realisiert. Eingebracht wurde die Fremd-RNA mittels lipid-basierter transienter Transfektion. Hierbei wird die siRNA mit Hilfe von Liposomen endozytiert und bewirkt intrazellulär die Inhibition der Ziel-mRNA (Elbashir *et al.*, 2001).

3.4.1. siRNA-Sequenzen

Verwendet wurde spezifische siRNA mit bekannter Sequenz gegen SCF-mRNA (siSCF). Die Kontrollgruppe (sicontrol) bildete eine siRNA-Sequenz, bei der die Beeinflussung aller humanen Gene ausgeschlossen war. Die Sequenzen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Herstellerbezeichnung	Sequenz
siSCF-forward	UGAAGAGGAUAAUGAGAU
siSCF-reverse	AUAGAGUAAUAGGAGAAGU
sicontr-forward	UAGCGACUAACAUCAA
sicontr-reverse	AACUACAAUCAGCGAU

Tabelle 9: Verwendete siRNA-Sequenzen

3.4.2. Durchführung

Bei sämtlichen Arbeitsschritten der Transfektion wurde steril und RNase-frei unter der Laminar-Flow Werkbank gearbeitet.

Die als Trockensubstanz erhältlichen siRNA-Einzelstränge mussten auf 100 pmol siRNA pro 1 µl sterilem und DNase-/RNase freiem Wasser gelöst werden. Für die Endkonzentration von 40 µmol wurden die selben Volumina Vorwärts- und Rückwärts-Strang mit 20% Annealing-Puffer gemischt, auf 96 °C für 1 min erhitzt und weitere 60 min bei 37 °C inkubiert.

Die Karzinomzellen wurden in T12,5-, T25- oder T75-Flaschen ausgesät und bei 70% Konfluenz transfiziert.

Zur Herstellung des Transfektionsgemisches dienten die Angaben des Herstellers. Es wurde ein Verhältnis von siRNA zu Lipofectamine™ 2000 von 1:1 gewählt; siRNA, bzw. Lipofectamine™ 2000 wurde mit serumfreiem Medium (Opti-MEM®) 1:63,5 gemischt (vgl. Tabelle 10). Zuerst wurde Lipofectamine™ 2000 mit Opti-MEM® für 5 min auf dem Rüttler vermengt, sowie in einem zweiten Röhrchen siRNA mit Opti-MEM®. Nach Zusammenführen der beiden Gemische wurde das Transfektionsgemisch bei Raumtemperatur für 20 min auf dem Rüttler inkubiert.

Kulturflasche	siRNA	Lipofectamine™ 2000	Opti-MEM®
T12,5	4 µl	4 µl	500 µl
T25	8 µl	8 µl	1000 µl
T75	24 µl	24 µl	3000 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung Transfektionsgemisch

Die Zellkulturen wurden zweimalig mit DPBS-Puffer gewaschen und mit Transfektionsgemisch und Transfektionsmedium im Verhältnis 1:4 versetzt. Nach 5 h Inkubation bei 37 °C wurde der Transfektionsvorgang durch Zugabe serumhaltigen Mediums (25% des bereits vorhandenen Volumens) gestoppt. 24 h später erfolgte ein kompletter Mediumswechsel auf RPMI-Kulturmedium mit 10% FCS.

3.5. Bestrahlung

Die Bestrahlung wurde mit einem Linearbeschleuniger der Firma Elekta Typ Elekta Synergy in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie durchgeführt. Bei einer Beschleunigungsspannung von 6 MV lag die maximale Dosisrate bei 4 Gy/min. Mit einem Abstand von 105 cm zum Fokus des Beschleunigers wurden die Kulturflaschen, bzw. Platten, von unten mit unterschiedlichen Dosen (Tabelle 11: Bestrahlungsdosen entsprechend Versuchsaufbau) bei Raumtemperatur bestrahlt. Der Abstand kam durch eine Tischhöhe von 100 cm, sowie 5 jeweils 1 cm starke RW3-Platten von wasseräquivalenter Dichte (RW3: 1,045 g/cm³, Wasser: 1,0 g/cm³) zustande. Diese RW3-Platten, ebenso wie eine zusätzlich auf die Flaschen aufgelegte Platte, dienten der Dosismaximierung in der Zellkultur.

Versuchsaufbau	Strahlendosis [Gy]
Koloniebildungstest	1, 2, 4, 6, 8
Invasionstest	6
RNA- und Proteinisolation	2, 6

Tabelle 11: Bestrahlungsdosen entsprechend Versuchsaufbau

3.6. Koloniebildungstest

Bestrahlung schädigt über unterschiedliche Mechanismen die unbegrenzte Teilungsfähigkeit der Tumorzellen (Herrmann, Baumann und Dörr, 2006). Der so erreichte reproduktive Zelltod ist definiert als die Unfähigkeit einer Zelle sich so oft zu teilen, dass eine Kolonie von mindestens 50 Tochterzellen entsteht. Als Goldstandard zur Testung des klonogenen Überlebens gilt der Koloniebildungstest (Wannenmacher, Debus und Wenz, 2006), mit dem neben der Toxizität der Bestrahlung auch der Einfluss einer SCF-Inhibition geprüft werden kann.

3.6.1. Durchführung in 2D-Kultur

Wie bereits beschrieben, wurden die Zellen transfiziert und nach 24 h mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy bestrahlt. Direkt im Anschluss erfolgte die Ausplattierung auf 6 cm² Kulturschalen in 4 ml Kulturmedium. Die Zellzahlen wurden entsprechend Vorversuchen so gewählt, dass sich pro Platte ca. 50-150 Kolonien bildeten. Pro Bestrahlungsdosis und Versuchsgruppe wurde jeweils eine Dreifachbestimmung vorgenommen, so dass insgesamt für eine Zelllinie 54 Platten ausgesät wurden.

Nach 7-14 Tagen wurden die Kolonien mit 2 ml 70% Ethanol für 10 min fixiert, mit Kristallviolett 5 min gefärbt und zweimalig in Wasser gespült. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt (Abbildung 3). Zur Kontrolle wurde unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl einer Kolonie (mindestens 50) stichprobenartig bestimmt.

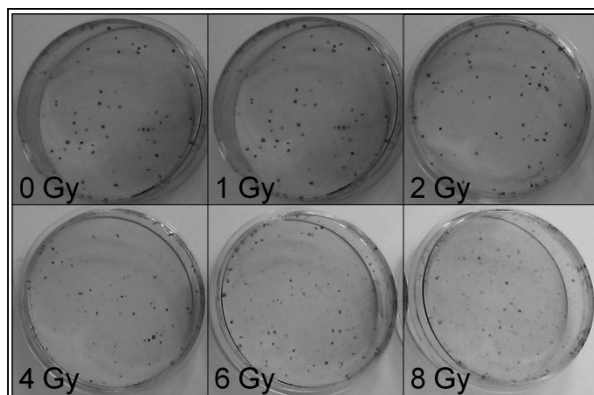
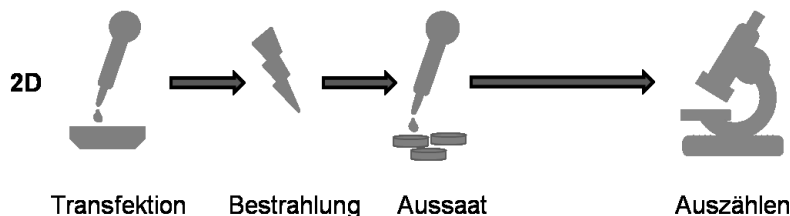


Abbildung 3: Koloniebildungstest in 2D-Kultur nach verschiedenen Bestrahlungsdosen.

Schematische Durchführung in 2D-Kultur und Kulturschalen mit angefärbten Kolonien (Zelllinie H226).

3.6.2. Durchführung in 3D-Kultur

Für den Koloniebildungstest unter 3D-Bedingungen wurden die Zellen 24 h nach Transfektion auf 96-Loch-Platten entsprechend 3.2.3. ausgesät. Die in Vorversuchen ermittelten Zellzahlen sollten bei dieser Raumgröße 500 Zellen/Well nicht überschreiten. Entsprechend der Dosis und Behandlung wurden die Zellzahlen so festgelegt, dass sich zwischen 20 und 60 Kolonien ausbilden konnten.

Erst nach Aussaat in 3D-Matrix erfolgte nach 24 h die Bestrahlung mit entsprechend 1, 2, 4, 6 und 8 Gy. Nach 7-14 Tagen konnten die Kolonien unter dem Lichtmikroskop bei 25-facher Vergrößerung ausgezählt werden (Abbildung 4).

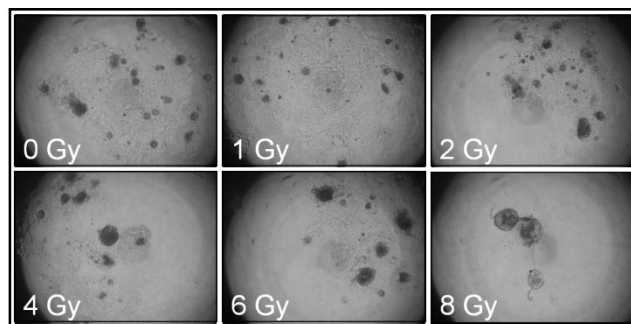
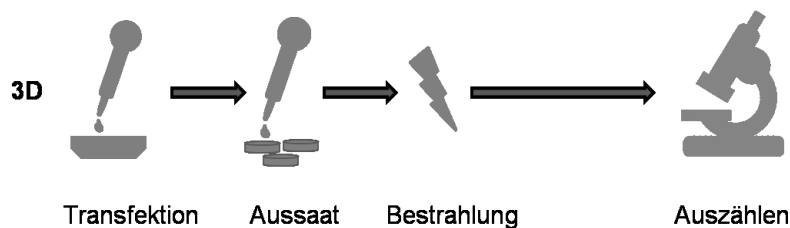


Abbildung 4: Koloniebildungstest in 3D-Kultur nach verschiedenen Bestrahlungsdosen.

Schematische Durchführung in 3D-Kultur und Kolonien (Zelllinie H23) bei 25-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop.

3.6.3. Auswertung

Bestimmt wurde die Effizienz der Zellen sich zu teilen und damit Kolonien auszubilden, die sog. Plattierungseffizienz (PE).

$$PE = \frac{Z(K)}{Z(A)}$$

$Z(K)$ = Anzahl gezählter Kolonien

$Z(A)$ = Anzahl ausgesäter Zellen

Formel 4: Berechnung der Plattierungseffizienz

Mithilfe der PE konnte weiter die Überlebensfraktion (engl. *survival fraction* (SF)), also die relative Überlebensrate bestrahlter Zellen im Verhältnis zu nicht bestrahlten Zellen, berechnet werden.

$$SF = \frac{PE(x \text{ Gy})}{PE(0 \text{ Gy})}$$

PE (x Gy) = Plattierungseffizienz der bestrahlten Gruppe

PE (0 Gy) = Plattierungseffizienz der unbestrahlten Gruppe

Formel 5: Berechnung der Überlebensfraktion

3.7. Invasionstest

Hierbei werden die Zellen auf ihre Fähigkeit untersucht, ob sie Protease-vermittelt eine künstliche Basalmembran überschreiten können. Als Anreiz für die Invasion dient ein Nährstoffgradient, der zwischen Kontrollkammer und Probeneinsatz mittels FCS erzeugt wird. Den Boden der Probeneinsätze bildet eine Membran mit 8 µm großen Poren, die mit einer Matrix beschichtet ist. Als Migrations-Kontrolle dienen unbeschichtete Einsätze (Abbildung 5). Für alle Gruppen (vgl. 3.3) wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

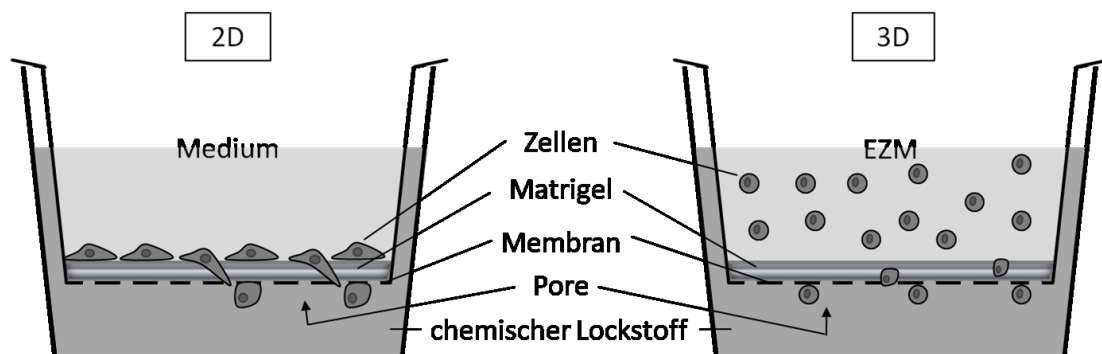


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Invasions-Test-Kammern in 2D und 3D.

3.7.1. Durchführung in 2D-Kultur

Es wurden entsprechend 3.4 behandelte Zellen nach 24 h mit 6 Gy bestrahlt. Danach wurden sie gewaschen, die benötigte Zellzahl bestimmt und in Medium mit 1% FCS suspendiert. Zur Rehydrierung der Einsätze wurden sie bis RT erwärmt, steril in 24-Loch-Platten eingesetzt und mit 500 µl FCS-freiem Medium für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Die Probenkammern der 24-Loch-Platte wurden mit 800 µl Medium (10% FCS) gefüllt und in die rehydrierten

Einsätze Zellsuspension gegeben, so dass pro Einsatz 9000 Zellen in 500 µl 1%-igem FCS-Medium vorlagen. Luftblasen an der Einsatzunterseite galt es hierbei zu vermeiden. Für die Negativkontrolle sollte kein Nährstoffanreiz gegeben werden, und dementsprechend wurde ebenfalls 1%-iges FCS-Medium in den Probekammern verwendet. Nach 22-24 h Inkubation der Platten bei 37 °C mussten die migrierten Zellen am unteren Boden der Einsätze lichtmikroskopisch (50-fache Vergrößerung) beurteilt und bei ausreichender Zellzahl gefärbt werden. Hierzu wurden die Probeneinsätze vorsichtig, ohne die Unterseite der Membran zu berühren, abgeschüttet und in einer Färbe-Platte (24-Loch) mit 500 µl vorgelegtem Kristallviolett für 5 min eingesetzt. Zum Waschen wurde das Kristallviolett abgekippt, die Einsätze in eine mit 500 µl Aqua dest. vorgelegte 24-Loch-Platte gestellt und nochmal im Wasserbad gespült. Die Einsätze wurden vorsichtig mit Zellulose von innen ausgewischt. Nach dem Trocknen konnten die Zellen, die sich am unteren Boden der Einsätze befanden, lichtmikroskopisch ausgezählt werden.

3.7.2. Durchführung in 3D-Kultur

Um die Zellen aus einer 3D-Matrix invadieren bzw. migrieren zu lassen, wurden sie entsprechend 3.2.3 in einer 10%-igen laminin-reichen extrazellulären Matrix in die rehydrierten Probeneinsätze gegeben. Nach 2 h Ruhezeit im Brutschrank wurde die Matrix jeder Probe durch Zugabe von 1%-FCS-haltigem Medium auf 0,5 mg/ml verdünnt. Waschen, Trocknen und Zählen entsprach dem Vorgehen in 2D-Kultur (3.7.1).

3.7.3. Auswertung

Der Mittelwert der invadierten Zellen wurde ins Verhältnis zu den migrierten Zellen gesetzt, wodurch man die prozentuale Invasion erhielt.

$$ZB [\%] = \frac{M(Inv)}{M(Mig)} \times 100$$

ZB = Zellbeweglichkeit/Invasion

M(Inv) = Mittelwert der invadierten Zellen (beschichtete Einsätze)

M(Mig) = Mittelwert der migrierten Zellen (unbeschichtete Einsätze)

Formel 6: Berechnung der prozentualen Zellbeweglichkeit [%]

3.8. Probengewinnung für RNA- und Proteinextraktion

3.8.1. Probengewinnung aus 2D-kultivierten Zellen

Für die Probengewinnung wurden die Zellen entsprechend dem Versuchsaufbau unter 3.3 auf T-25-Kulturflaschen ausgesät, transfiziert, nach 24 h mit 2 bzw. 6 Gy bestrahlt und nach weiteren 24 h gestoppt. Um ausreichend RNA bzw. Proteine extrahieren zu können, musste der Zellrasen eine Konfluenz von 80-90% aufweisen. Das vorhandene Medium wurde abgesaugt, die Zellen zweimalig mit DPBS gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Lösungen (siehe 3.9.1 und 3.10.1) gestoppt.

3.8.2. Probengewinnung aus 3D-kultivierten Zellen

Um RNA oder Proteine aus Zellen, die in einer 3D-Matrix gewachsen waren und bestrahlt wurden, gewinnen zu können, wurden ausreichend Zellen transfiziert (siehe 3.4.2) und nach 24 h in 24-Loch-Platten entsprechend 3.2.3 ausgesät. Um genug Material zu extrahieren, wurden pro Gruppe 2 Well ausgesät. Nach weiteren 24 h erfolgte die Bestrahlung mit 2 bzw. 6 Gy und weitere 24 h später wurden die Proben gestoppt.

Hierfür musste das Zellpellet durch vorsichtiges Anspülen gelöst und möglichst ohne 3D-Matrix in ein Reaktionsgefäß pipetiert werden. Die Matrix konnte bei 250 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und verworfen werden. Die Probe wurde zweimalig mit 1 ml kaltem DPBS und durch anschließende erneute Zentrifugation und Abnehmen des Überstands gewaschen.

3.9. Quantitative Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Zur quantitativen Bestimmung der Expression sowohl von SCF und c-Kit als auch invasionsspezifischer Gene auf mRNA-Ebene und deren Veränderung unter SCF-Inhibition und Bestrahlung wurde mRNA aus zuvor entsprechend (siehe Versuchsaufbau) behandelten Zellen isoliert. Mittels reverser Transkription wurden die mRNA-Moleküle in stabilere und besser vervielfältigbare cDNA umgeschrieben. Dann erfolgte die Amplifikation, also Vermehrung, und quantitative Auswertung der DNA mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion und Bezug auf ein nicht reguliertes "*housekeeping gen*" (Polo, Itokazu und Murakami Iha, 2004).

3.9.1. RNA-Gewinnung

Beim Stoppen der Zellen mittels optimierter Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode zur RNA-Gewinnung wurde auf Eis gearbeitet, um den Zellzyklus möglichst früh zu unterbrechen.

3.9.1.1. RNA-Gewinnung aus 2D-kultivierten Zellen

Nach Behandlung und Reinigen der Zellkulturen entsprechend 3.8.1 wurde jede Probe mit 1 ml TriFast versetzt. Mittels Schaber wurden die Zellen von der Kulturflasche mechanisch gelöst, die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.9.1.2. RNA-Gewinnung aus 3D-kultivierten Zellen

Das entsprechend 3.8.2 aufbereitete Zellpellet wurde mit 1 ml TriFast versetzt. Die Proben mussten bis zur vollständigen Lyse resuspendiert und gevortext werden. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.9.2. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde auf Eis mit gekühlten Materialien streng RNase-frei durchgeführt, um eine Degradation der RNA zu verhindern.

Nach Auftauen der mit TriFast lysierten Proben auf Eis wurden sie zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zugabe von 200 µl Chloroform/1 ml TriFast, 15-sekündiges, kräftiges Schütteln, erneutes Inkubieren für 5 min bei RT und anschließender Zentrifugation (14.000 g bei 4 °C für 5 min). Die oberste, wässrig-klaare Phase der so entstandenen dreischichtigen Lösung wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und konnte bei -80 °C gelagert werden.

Zur RNA-Präzipitation musste der RNA-enthaltenden, wässrigen Phase 500 µl Isopropanol pro 1000 µl TriFast zugesetzt, die Probe geschwenkt, für 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert werden. Nach Abnahme des Isopropanolüberstands wurde das RNA-Pellet zweimalig mit 1 ml 75% Ethanol und durch Zentrifugation für 10 min gewaschen. Bevor das Pellet in 30 µl RNase-freien Wassers gelöst werden konnte, wurde es für 20 min bei offenem Reaktionsgefäß auf Eis getrocknet.

3.9.3. Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch mittels NanoDrop[®] - Spektrophotometer bestimmt. Hierfür war bereits 1 µl der Probe ausreichend. Durch Absorptionsmessung bei Wellenlänge 260 nm wurde die Konzentration der RNA ermittelt. Zusätzlich erfolgte eine graphische Darstellung des Absorptionsspektrums

zwischen 220 nm und 350 nm. Substanzen, die die Absorptionsmessung beeinflussen könnten (z. B. Lösungsmittel oder Proteinverunreinigungen) konnten so detektiert werden. Zur Kontrolle des Reinheitsgrades der Proben wurde der Absorptionsquotient der Wellenlänge 260 und 280 nm bestimmt. Werte zwischen 1,65 und 2,0 sprechen für möglichst reine RNA.

3.9.4. Reverse Transkription- Herstellung von cDNA

Da mit der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nur DNA analysiert werden kann, musste die isolierte RNA mittels Oligo(dt)18 Primer und Reverser Transkription in wesentlich stabilere cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Kern dieses Umschreibevorgangs stellt das Enzym Reverse Transkriptase (RT), die bereits um 1970 unabhängig von Howard Temin und David Baltimore erstmals beschrieben wurde, dar (Coffin und Fan, 2016). Inzwischen sind unterschiedliche dieser Enzyme verschiedener Herkunft und Aktivität bekannt. Es handelt sich um RNA-abhängige DNA-Polymerasen, d.h. sie können neben einem DNA- auch einen RNA-Einzelstrang als Matrize verwenden. Zunächst heftet sich die Polymerase an den RNA-Einzelstrang und synthetisiert einen komplementären DNA-Strang (*RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität*). Durch ihre *Exoribonukleaseaktivität* ist die RT weiter dazu in der Lage, den so entstandenen Hybridstrang zu hydrolysieren. An den so freigelegten DNA-Einzelstrang kann sie anschließend einen kompletten DNA-Doppelstrang synthetisieren (*DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität*).

Zum Schutz vor Verunreinigung durch ubiquitär vorhandene DNA, RNA und DNasen/RNasen wurde für die folgenden Schritte an einem DNasen/RNasen-freien Platz mit entsprechend aufgearbeiteten Materialien auf Eis gearbeitet.

Es wurde 1 µg Proben-RNA mit 1 µl Oligo(dt)18 Primer in ein Reaktionsgefäß pipetiert und nach Auffüllen mit Aqua bidestillata auf ein Volumen von 12,5 µl kurz abzentrifugiert. Um ein Auftrennen der Sekundärstruktur und Bindung des Primers zu ermöglichen, wurde der Ansatz bei 65 °C für 5 min im Thermocycler inkubiert. Nach Abkühlung auf 4 °C wurde jeder Probe 7,5 µl eines neu angesetzten cDNA-Mastermix (vgl. Tabelle 6: Zusammensetzung verwendeter Lösungen) zugefügt. Hierin enthalten waren neben der reversen Transkriptase Desoxyribonukleosidtriphosphate, RNase Inhibitoren und Reaktionspuffer. Die Reverse Transkription fand bei optimalen Bedingungen unter 42 °C statt und wurde nach 60 min durch Erhitzen der Proben auf 70 °C für 10 min beendet. Nach Abkühlen auf 4 °C konnten die Proben bei -20 °C eingefroren und gelagert oder weiter verwendet werden.

3.9.5. Quantitative Real-Time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, kurz PCR) bezeichnet ein enzymbasiertes Verfahren, mit dem spezifische Sequenzbereiche eines DNA-Moleküls *in vitro* schnell vervielfältigt werden können.

Das Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht auf drei temperaturabhängigen Schritten, die bereits 1971 beschrieben, und 1988 weiter optimiert wurden (Kleppe *et al.*, 1971; Cohen, Tiplica und Kobi, 2016) (siehe auch Abbildung 6):

1. Denaturierung: Ein doppelsträngiges DNA-Molekül wird erhitzt, wodurch die stabilisierend wirkenden Wasserstoffbrücken gespalten werden. Die DNA-Einzelstränge liegen nun separiert vor.
2. Annealing/ Primer-Bindung: Durch Absenken der Temperatur können sich spezifische Oligodesoxyribonukleotide, sog. Primer, komplementär an die nun als Matrize dienenden Einzelstränge anlagern.
3. Polymerisation: Durch eine thermostabile Polymerase katalysiert, werden Desoxyribonukleotide komplementär des Matrizenstrangs angelagert. Startpunkt stellt der zuvor komplementär gebundene Primer dar. So entsteht ein der Matrize angelagerter komplementärer DNA-Strang.

Durch Wiederholung dieser Schritte nimmt die Gesamt-Produktmenge exponentiell zu, ist jedoch limitiert durch beispielsweise die Anzahl vorhandener Oligonukleotide (Primer) und Desoxyribonukleotide. D. h. nach einer konstanten exponentiellen Produktbildung nimmt diese wieder bis auf Null ab, die Gesamtmenge an PCR-Produkten erreicht einen Plateauwert.

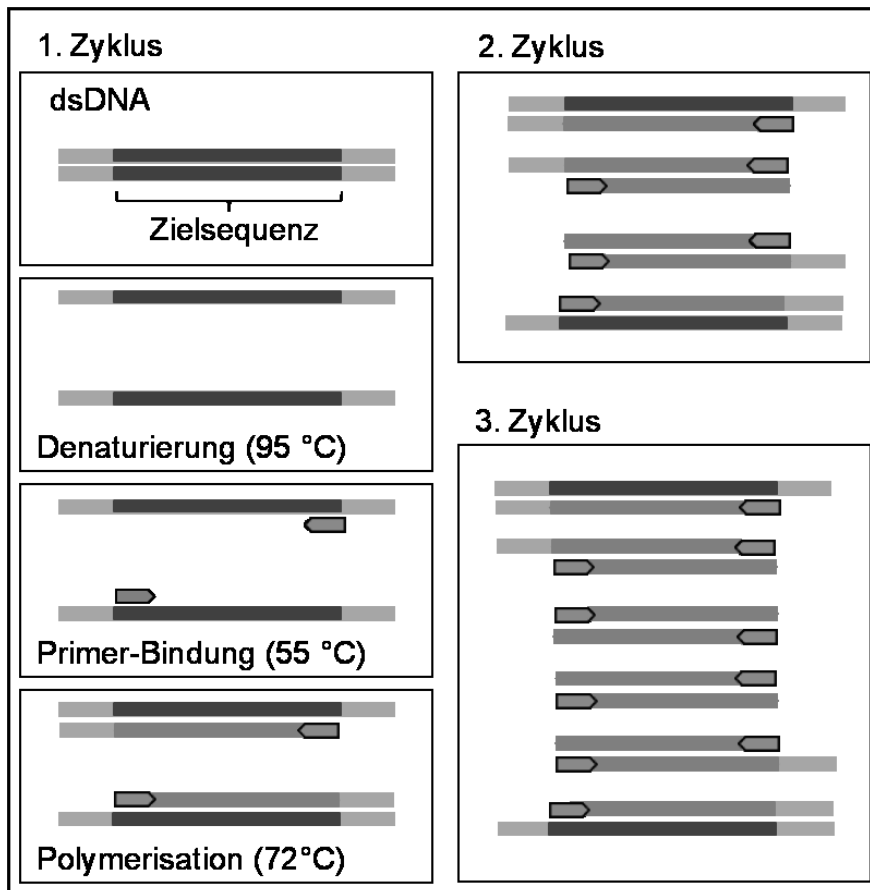


Abbildung 6: Schematische Darstellung der PCR.

Ein doppelsträngiges DNA-Molekül (dsDNA) mit einer Zielsequenz wird durch Erhitzen in Einzelstränge separiert (Denaturierung), an die sich nach Abkühlen Primer an zu ihnen komplementären Abschnitten hybridisieren (Primer-Bindung). Sie dienen als Startpunkt der nun durch die thermostabile DNA-Polymerase katalysierte Polymerisation. So entstehen erneut doppelsträngige Produkte, deren Gesamtmenge mit jedem Durchlauf des Temperaturprofils (Zyklus) exponentiell zunimmt.

Sind die End-Sequenzen eines DNA-Moleküls bekannt, lässt es sich mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifizieren. Um beurteilen zu können, ob eine Zielsequenz, in unserem Fall ein Gen, vermehrt oder vermindert exprimiert wird, muss eine Quantifizierung der Zielsequenz erfolgen. Um eine meist sehr aufwendige und teils auch nicht realisierbare direkte Quantifizierung zu umgehen, bedient man sich der quantitativen PCR: hierbei wird die Amplifikation der zu quantifizierenden Sequenzen quantitativ analysiert. Möglich ist dies, da in der anfänglichen exponentiellen Reaktionsphase die Produktakkumulation durch einfache mathematische Beziehungen beschreibbar ist. Wird diese Akkumulationsphase in Echtzeit verfolgt und gemessen, spricht man von *real-time*-PCR (kurz auch RT-PCR) (Higuchi *et al.*, 1993; Polo, Itokazu und Murakami Iha, 2004). Realisiert werden kann diese Messung durch einen dsDNA-

sensitiven Farbstoff, beispielsweise SYBR Green I. SYBR Green I bindet, weitestgehend sequenzunspezifisch, an doppelsträngige DNA, genauer an den kleinen Furchen zwischen den Basen. So gebundener Farbstoff fluoresziert nach Anregung weitaus stärker (ca. 1000mal) als ungebundenes SYBR Green I (siehe auch Abbildung 7). So kann die Akkumulation der Amplifikate (Doppelstrang-DNA) einfach sichtbar und messbar gemacht werden (Wittwer *et al.*, 2013; Weinbaum, 2015). Da der Farbstoff jedoch unspezifisch in jeglichen DNA-Doppelstrang eingelagert wird, somit auch zwischen Primer-Dimere, kann es zu ungenauen und falschen Fluoreszenzmessungen kommen. Neben genauestem Arbeiten unter Verwendung spezieller Puffer und stringent optimierter PCR-Bedingungen wird eine hohe Spezifität und Sensitivität möglich. Zur Kontrolle der Produktspezifität, wird am Ende der Amplifikation als letzter Programmpunkt (vgl. auch 3.9.5.2) eine Schmelztemperaturanalyse durchgeführt. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass durch kontinuierliches Erhitzen der gebildeten Amplifikate ein für das Produkt spezifischer Signalabfall detektiert werden kann, nämlich dann, wenn alle DNA-Doppelstränge aufgeschmolzen sind. Die Schmelztemperatur wird dabei von Länge, Sequenz und GC-Gehalt des DNA-Doppelstranges bestimmt. Befinden sich neben der Zielsequenz auch unspezifische Produkte oder Primer-Dimere im Ansatz, zeigt die Kurve mehr als einen Gipfel.

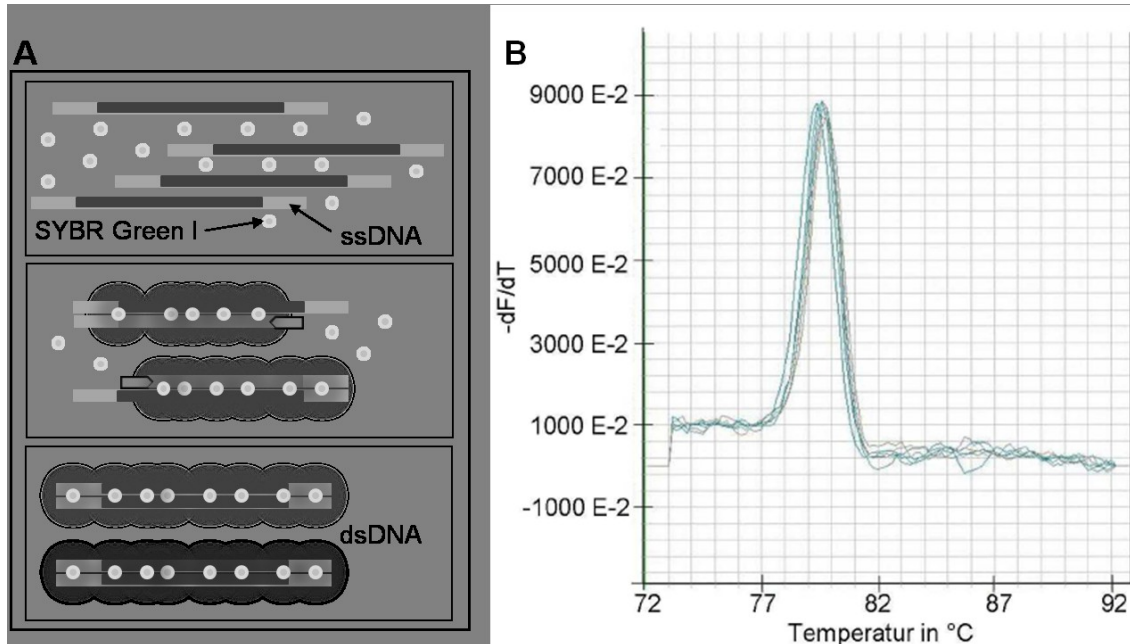


Abbildung 7: SYBR-Green I-Fluoreszenzsignalgenerierung und Schmelzkurve.

A. Fluoreszenzsignal während der PCR durch SYBR-Green I. *Frei in Lösung befindliche SYBR-Green I-Moleküle absorbieren kein Anregungslicht. Hingegen fluoresziert der in der kleinen Furche der dsDNA gebundene Farbstoff nach Anregung.* **B. Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf.** *Anhand der Schmelzkurve können die amplifizierten Produkte durch einen spezifischen Peak verifiziert werden.*

3.9.5.1. *Primer*

Anhand der NCBI Datenbank konnten die benötigten Sequenzen festgelegt und entsprechende Primer zur Herstellung in Auftrag gegeben werden. Die generierten Primer wurden als Primerstocklösung geliefert, die mit Aqua bidestillata auf ein Volumen von 100 pmol/µl verdünnt werden musste.

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Annealing-Temperatur (°C)	Amplifikationslänge (Basenpaare bp)
PBGD	F: 5'-CAG CTT GCT CGC ATA CAG AC-3' R: 5'-GAA TCT TGT CCC CTG TGG TG-3'	60	106
SCF	F: 5'-GGA TGG ATG TTT TGC CAA GT-3' R: 5'-TCT TTC ACG CAC TCC ACA AG-3'	57	172
c-KIT	F: 5'- CCG GTC GAT TCT AAG TTC TAC-3', R: 5'-GAT TGG TGC TCT CTG AAA TCTG-3'	60	181
N-CAD	F: 5'-CAA TCC TCC AGA GTT TAC TGC CAT G-3 R: 5'-GAT TGG TTT GAC CAC GGT GAC TAA C-3'	63	220
E-CAD	F: 5'-TGA AAA GAG AGT GGA AGT GTC CGA G-3' R: 5'-GAT TAG GGC TGT GTA CGT GCT GTT C-3'	63	229
VIM	F:5'-GCA AAG CAG GAG TCC ACT GAG TAC C-3' R: 5'-TGT CAA GGG CCA TCT TAA CAT TGA G-3'	61-66	200

Tabelle 12: Primer

3.9.5.1.1. Primer-Effizienz

Zur Bestimmung der Effizienz wurde für jeden Primer eine Verdünnungsreihe von 1 bis 1:1024 gemessen und die Ct-Werte der einzelnen Verdünnungen gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen Konzentration aufgetragen, wodurch man eine Gerade erhielt. Deren Steigung konnte über die lineare Regression ermittelt und damit die Primer-Effizienz über folgende Formel berechnet werden:

$$E = 10^{-1/m}$$

E = Effizienz

m = Steigung der Regressionsgeraden

Formel 7: Berechnung der Primer-Effizienz

Eine Effizienz nahe 2 wurde als gut bewertet.

Genname	Gensymbol	Primer-Effizienz E
Porphobilinogen Deaminase	PBGD	2,02
Stammzellfaktor	SCF	2,10
Tyrosinkinase-Rezeptor c-Kit	c-KIT	1,99
N-Cadherin	N-CAD	1,86
E-Cadherin	E-CAD	1,86
Vimentin	VIM	2,18

Tabelle 13: Primer-Effizienzen

3.9.5.1.2. Primer-Spezifität

Nach Messung der Verdünnungsreihe wurden die PCR-Produkte im Agarose-Gel auf ihr Molekulargewicht hin untersucht und anhand eines Gewichtstandards verifiziert.

Nach Herstellung und Aushärtung des Gels im Dunkeln, wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit 1xTEA-Puffer aufgefüllt. Das Gel wurde mit 2,5 µl Probe und 1 µl Loading-Puffer beladen und für 30 min bei 120 V und 200 mA oder 15 min bei 400 V und 250 mA angeschlossen. Die Banden konnten anschließend mit Hilfe eines Fluorimeters detektiert, das Molekulargewicht anhand des Gewichtsstandards abgelesen und mit Literaturangaben abgeglichen werden.

3.9.5.2. Durchführung

Für die qRT-PCR wurde der Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG verwendet. Hierin enthalten waren neben einer thermostabilen tagDNA-Polymerase, die Desoxyribunukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, die Uracil DNA-Glykosylase (UDG), der sdDNA Farbstoff SYBR Green I sowie Puffer und Stabilisatoren. UDG in

Kombination mit dUTP anstelle von dTTP sollten hierbei verhindern, dass PCR-Produkte aus vorherigen Durchgängen verschleppt werden (Longo, Berninger und Hartley, 1990). Für den Ansatz des PCR-Mastermix (siehe auch Tabelle 6) wurde je Probe 12,5 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, 1 µl Primerlösung des jeweiligen Zielgens (forward und reverse, jeweils 10 pmol/µl), 1 µl MgCl₂ als Reaktionsbeschleuniger und 9,5 µl Aqua bidestillata angesetzt. Hiervon wurden 24 µl mit 1 µl der zuvor generierten cDNA in die Vertiefungen einer 96-Loch-PCR-Platte gegeben, mittels Klebefolie verschlossen, um ein Verdampfen und eine Kontamination des Reaktionsgemisches zu verhindern, und abzentrifugiert. Im PCR-Cycler ABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) durchliefen die Proben folgende Programme und wurden entsprechend erhitzt und abgekühlt:

Programm 1: UDG Inkubation: 2 min bei 50 °C

Programm 2: Inaktivierung der UDG & Aktivierung der Taq-Polymerase: 5 s bei 95 °C

Programm 3: Amplifikation: hierfür jeweils 45 Zyklen

Segment 1: Denaturierung der DNA-Doppelstränge: 5 s bei 95 °C

Segment 2: Primer- Annealing: 5 s bei 60 °C,

Segment 3: Elongation der Einzelstrang-DNA mittels thermostabiler Polymerase und Oligonucleotiden: 10 s bei 72 °C, dann abschließende Fluoreszenz-Signaldetektion des an Doppelstrang-DNA gebundenen SYBR Green I

Programm 4: Schmelzkurvenanalyse: 72 °C für 10 s und 95 °C für 5 s.

3.9.5.3. Auswertung

Zur Auswertung der PCR berechnete die verwendete Computersoftware nach Messung der Fluoreszenzsignale (Amplifikationskurve) jedes Zykluses den sog. Ct-Wert. Dieser beschreibt die Anzahl an Zyklen, die für den jeweiligen Ansatz benötigt werden, bis das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert, nämlich dann, wenn sich jede Einzelreaktion in der exponentiellen Phase befindet, überschreitet. Hierbei leitet sich C vom eng. *cycle* (Zyklus) und t von eng. *threshold* (Schwellenwert) ab. Dies bedeutet, dass bei geringer Templet-Ausgangszahl im Ansatz viele Zyklen durchlaufen werden müssen, um den Schwellenwert zu erreichen. Demnach verhält sich die Ausgangsmenge antiproportional zum Ct-Wert. Zur relativen Quantifizierung wurden die so ermittelten Ct-Werte mit dem Ct-Wert eines Referenzgens in Beziehung gesetzt (siehe Formel 8: Berechnung des Δ Ct-Werts). In dieser Arbeit wurde

Porphobilinogen Deaminase (PBGD) als Referenzgen gewählt, da es bei den vorliegenden Versuchsbedingungen weitestgehend konstant exprimiert wird.

$$\Delta Ct = Ct(Z) - Ct(R)$$

Ct(Z)= Ct-Wert des Zielgens

Ct(R)= Ct-Wert des Referenzgens (PBGD)

Formel 8: Berechnung des ΔCt -Werts

Bei einem Vergleich der ΔCt -Werte verschiedener Versuchsgruppen konnten so Rückschlüsse auf die Expression des untersuchten Gens gezogen werden. Hierbei galt es zu beachten, dass von einer verminderten Expression ausgegangen werden musste, wenn der ΔCt -Wert erhöht war. Um dieses gegenläufige Verhalten vor allem in bildlicher Darstellung verständlicher zu gestalten, wurden die ΔCt -Werte als $-\Delta Ct$ -Werte dargestellt.

Um behandelte Gruppen und deren Gen-Expression mit der Kontrollgruppe zu vergleichen, wurde der $\Delta\Delta Ct$ -Wert gebildet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(B) - \Delta Ct(K)$$

$\Delta Ct(B)$ = ΔCt -Wert der behandelten Gruppe

$\Delta Ct (K)$ = ΔCt -Wert der Kontrollgruppe

Formel 9: Berechnung des $\Delta\Delta Ct$ -Werts

3.10. Western Blot

Der Nachweis von Proteinen erfolgte in dieser Arbeit mittels Western Blot. Die extrahierten Proteine werden hierbei durch SDS-Page-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF-)Membran übertragen. Zur Detektion der gesuchten Proteinbanden muss erst ein spezifischer Antikörper binden, an welchen sich ein Sekundärantikörper anlagern kann. Dieser ist mit einem Enzym gekoppelt, das eine Lichtreaktion katalysiert, wodurch die gesuchte Bande anhand des abgegebenen Lichts erfasst werden kann.

3.10.1. Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte nach Zellmembranlyse mittels RIPA-Puffer.

3.10.1.1. Extraktion aus 2D-kultivierten Zellen

Entsprechend 3.8.1 behandelte Proben wurden zur Proteingewinnung mit 100 µl RIPA-Puffer versetzt. Nach Abschaben der Zellen musste die Puffer-Zell-Suspension für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in ein Reaktionsgefäß pipetiert werden. Während weiterer 60 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension zur vollständigen Lyse mehrfach mit einer Pipette resuspendiert und anschließend bei 16.000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das Gesamtzelllysate wurde vorsichtig in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.10.1.2. Extraktion aus 3D-kultivierten Zellen

Nach Aufbereitung gemäß 3.8.2 wurde den Proben 200 µl RIPA-Puffer zugegeben, die Suspension bis zur Lösung des Pellets gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und schonend auf Eis 60 min aufgetaut. Es folgte die Zentrifugation (bei 16.000 g und 4 °C für 20 min) und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß zur Lagerung bei -80 °C.

3.10.2. Proteinmessung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde als Doppelmessung mittels Pierce® Protein Assay Kit durchgeführt. Als Referenz diente eine Verdünnungsreihe aus Albuminstandards mit Konzentrationen von 0-2.000 µg/ml gemäß Hersteller. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit RIPA-Puffer verdünnt. Sowohl der Standard als auch die Proben wurden auf einer 69-Well-Platte mit jeweils 200 µl eines entsprechend Herstellerangaben neu angesetztem Working Reagenz (*BCA Reagent A + BCA Reagent B* im Verhält 50:1) versetzt, für 30 s auf dem Rüttler gemischt und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach photometrischer Messung der Absorption bei 562 nm konnte mittels der Standardreihe die Proteinkonzentration berechnet werden.

3.10.3. Durchführung

Die entsprechend 3.10.2 ermittelten Proteinkonzentrationen der Proben wurden in µg/µl umgerechnet und die Proben so aufbereitet, dass 1 µg Protein pro µl Proben-Gemisch analysiert werden konnte. Da jede Geltasche 30 µl fasst, wurden 30 µg Protein mit Aqua bidestillata auf ein Volumen von 27 µl ausgeglichen. Zur Degradation wurden 3 µl 10-fach Probenpuffer zugegeben und die Proben auf ca. 100 °C für 5 min im Wasserbad erhitzt. Als Ladungskontrolle diente β-Actin, als Positiv-Kontrolle Proben aus humanen Umbilikalvenen gewonnene Endothelzellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)*), die die zu untersuchenden Proteine nachweislich exprimieren.

3.10.3.1. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide- (SDS-PAGE-) Gelelektrophorese

Proteine werden durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide*, kurz SDS-PAGE) denaturiert und damit ihre Ladung vereinheitlicht, so dass die Auftrennung entsprechend der molekularen Masse im Gel erfolgt.

Für das von c-Kit beschriebene Molekulargewicht von 145 kDa (Lennartsson und Ronnstrand 2012) wurde ein 8%-iges Trenngel hergestellt (siehe Tabelle 4), wobei Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) direkt vor Einbringen der Lösung in die Gelkammern zugefügt wurden. Dementsprechend wurde das Sammelgel (5%) erst nach Polymerisation des Trenngels mit TEMED und APS versetzt, aufgegossen und mittels Kamm luftdicht verschlossen. Um einen sauberen Übergang zwischen Sammel- und Trenngel zu erzielen, wurde zur Aushärtung des Trenngels 75% Ethanol vorsichtig aufpipettiert und vor Zugabe des Sammelgels abgeschüttet.

Die Gelkammern wurden nach vorsichtiger Entfernung der Kämme in die Elektrophoresekammer eingesetzt, diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Probentaschen gespült. Die aufbereiteten Proben wurden luftblasenfrei eingebracht und ggf. leere Taschen mit Laufpuffer befüllt, um eine vertikale Laufrichtung zu gewährleisten. Zur Orientierung der Proteinlaufweite entsprechend der Molekülgröße wurde ein Gewichtsstandard aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 100 V für 90 min.

3.10.3.2. Semi-Dry-Blot

Zum Transfer der im Gel befindlichen, aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde ein Semi-Dry-Blotting Verfahren angewendet. Hierzu wurde die PVDF-Membran kurz in Methanol, anschließend 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und für 15 min in Semi-Dry-Transferpuffer gelegt. Zum eigentlichen Blotting wurden die Kathoden- und Anodenplatten großzügig mit Semi-Dry-Transferpuffer benetzt und ein 1,8 cm hoher Transferpuffer-getränkter Zellulosepapier-Stapel (Whatmann®-Paper) eingelegt. Darauf wurden die Membran und das Gel luftblasenfrei und ein weiterer Zellulosepapier-Stapel aufgesetzt. Die Blotkammer wurde mit der Anodenplatte verschlossen und mit 100 V bei Raumtemperatur für 90 min angeschlossen.

3.10.3.3. Blocken und Antikörper-Bindung

Zur Sättigung aller unspezifischen Protein-Bindungsstellen wurde die Membran für 90 min bei Raumtemperatur in 5%-igem BSA- oder Milch-Blockingpuffer auf einer Wippe inkubiert. Über Nacht wurde die Membran in verdünntem Primär-Antikörper

(1:2.000 mit BSA oder Milchpulver) auf den Rollschüttler bei 4 °C gelegt. Am folgenden Tag musste die Membran in 5-minütigen Waschschritten mit Waschpuffer (TBST 1-fach, vgl. Tabelle 5) dreimal gewaschen werden, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation der Membran mit Peroxidase (POD)-konjugiertem Sekundär-Antikörper für 2 h bei RT und anschließend erneutes Waschen.

Antikörper	Hersteller	Blockingpuffer/ Antikörper- Verdünnung
Anti-β-actin	Abcam, Cambridge, UK	5% Milch
Anti-c-KIT	CellSignaling, Leiden, NL	5% BSA
Anti-p-c-KIT	CellSignaling, Leiden, NL	5% BSA
Goat-anti-mouse	Abcam, Cambridge, UK	5% BSA
Goat-anti-rabbit	Abcam, Cambridge, UK	5% BSA
Anti-Vimentin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	5% Milch

Tabelle 14: Antikörper und Lösungen zur Verdünnung

3.10.3.4. Detektion

Die Erfassung der gebundenen Antikörper erfolgte mittels ECL-Lösung (vgl. Tabelle 6), in welcher die Membran 5 min bei RT inkubiert wurde. Das im Detergenz enthaltene Substrat wurde bei Anwesenheit einer Peroxidase (HRP= *horse-radish-peroxidase*), also nach Binden des spezifischen ersten und zweiten Antikörpers, unter Abgabe eines Lichtsignals umgesetzt. Dieses Signal konnte zur Belichtung eines Röntgenfilms genutzt und so die entsprechende Bande nach Filmentwicklung als dunkel gefärbte Stelle dargestellt werden.

3.10.3.5. Strippen

Dieser Schritt dient dazu, einen Blot auf verschiedene Proteine untersuchen zu können. Die Membran musste hierfür nach dem Entwickeln in neu angesetzttem Stripping-Puffer für 1 h bei RT auf einer Kippe inkubiert werden, um die vorhandenen Antikörper zu lösen. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen. Für die Darstellung eines anderen Proteins wurde analog zu 3.10.3.3 mit entsprechenden Antikörpern vorgegangen.

3.10.4. Auswertung mittels Densitometrie

Der Western Blot wurden mit Hilfe der Densitometrie ausgewertet. Hierbei wurde die Bandenschwärze des dargestellten Proteins auf dem Film im Dosimeter gemessen und gegen die Schwärzung des Referenzproteins β-Actin normalisiert. So konnte semiquantitativ die Proteinmenge bestimmt werden.

3.11. Statistische Auswertung

Mithilfe von Microsoft Office Excel 2007® konnten sämtliche erhobenen Daten dieser Arbeit erfasst und aufgearbeitet werden. Zur graphischen Darstellung und Berechnung statistischer Größen wurde GraphPad Prism 5 verwendet. Berechnet und dargestellt wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler der jeweiligen Vergleichsgruppen. Statistische Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test als parametrischem Test analysiert und bei $p \leq 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die verwendeten humanen NSCLC-Zelllinien auf die Expression von c-Kit und SCF untersucht. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem klonogenen Überleben, also der Fähigkeit einer Zelle sich nach Bestrahlung weiter zu teilen und eine Kolonie auszubilden. Diese Eigenschaft wurde mittels Koloniebildungstest und Erstellung einer Dosiseffektkurve verdeutlicht. Hierbei lag das Augenmerk auf dem Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen und dem Effekt der Ausschaltung von SCF mittels siRNA. Im letzten Teil wurde mittels Invasionstest der Einfluss von Kulturbedingungen, SCF und Photonenbestrahlung auf das Invasionsverhalten, also der Fähigkeit einzelner Zellen eine (künstliche) Basalmembran zu überschreiten, untersucht.

4.1. Expression von SCF und c-Kit - Große Unterschiede in den untersuchten Zelllinien

Es wurde die Genexpression von SCF und c-Kit unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen untersucht und der Expression in HUVECs (in 2D) gegenübergestellt. Abbildung 8 zeigt die in der quantitativen Real-Time RT-PCR ermittelten Expressionsunterschiede von c-Kit und SCF in H23- und H226-Zellen als $-\Delta\text{Ct}$ -Werte bezogen auf HUVECs sowie innerhalb einer Zelllinie zwischen 2D und 3D.

Es zeigte sich eine verminderte c-Kit-Expression beider Zelllinien im Vergleich zu HUVECs sowohl in 2D als auch in 3D. Die mRNA-Expression lag bei H23 im Mittel 3 Zyklen, bei den H226 12 Zyklen unter der HUVECs-Konzentration. Beim Vergleich der c-Kit-Expression einer Zelllinie unter verschiedenen Kulturbedingungen stellte sich in beiden Linien die Genexpression in 2D im Mittel um 2 (H23) bzw 1,5 (H226) Zyklen höher dar als in 3D. Das entspricht bei einer Effizienz von zwei einer Verdopplung bis Vervierfachung.

Die SCF-Expression lag in den H23-Zellen fünf Zyklen unterhalb der HUVECs. H226 zeigte ähnliche mRNA-Expressionslevel wie HUVECs. Beim Vergleich von 2D zu 3D fand sich bei H23 eine vierfach gesteigerte Expression in 2D-Kultur, während die H226-Zellen eine gesteigerte Expression um mehr als das Doppelte in 3D aufwies.

Ergebnisse

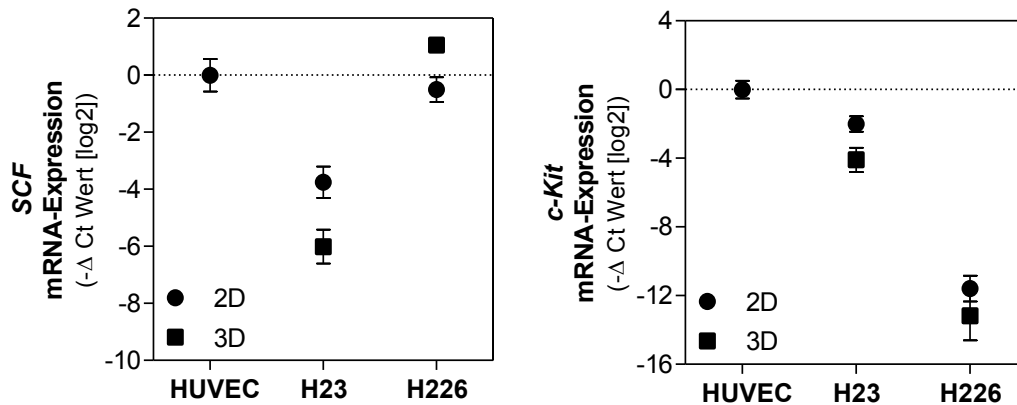


Abbildung 8: Expression von SCF und c-Kit in HUVECs und den Zelllinien H23 und H226 in 2D- und 3D-Kultur.

Erhöhte c-Kit-Expression in H23 im Vergleich zu H226. Die SCF-Expression in H226-Zellen hingegen ähnlich den Referenzzellen (HUVECs) und höher als in H23. Kein signifikanter Expressionsunterschied für beide Gene in unterschiedlichen Kulturbedingungen. Dargestellt sind die $-\Delta Ct$ -Werte, jeweils als Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 3$.

Für c-Kit und seine phosphorylierte Form (p-c-Kit) wurde des Weiteren auch die Proteinexpression der Zelllinien in 2D-Kultur mittels Western Blot untersucht und dargestellt (Abbildung 9). Hierbei dienten SCF-stimulierte HUVECs als Positiv-Referenz und β -Actin als Ladungskontrolle. Es zeigt sich entsprechend dem mRNA-Level, eine höhere c-Kit Expression der H23-Zellen im Vergleich zu den H226-Zellen. Im Vergleich zu den jedoch sehr hohen mRNA-Leveln der H23 Zellen, zeigte sich eine relativ geringe Proteinexpression. Es liegt also nahe, dass die c-Kit-Level nicht allein durch Transkription, sondern auch post-translatorische Prozesse bestimmt sind. Eine Autophosphorylierung konnte für beide Zelllinien ausgeschlossen werden.

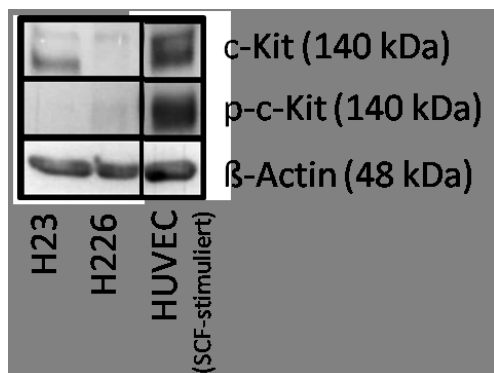


Abbildung 9: c-Kit-Expression im Western Blot der untersuchten Zelllinien in 2D-Kultur.

Die Zelllinie H23 exprimiert c-Kit, während eine Expression in den H226-Zellen nicht messbar ist. Dargestellt sind die Proteinbanden bei 140 kDa (entsprechen c-Kit und p-c-Kit) und β -Actin als Ladungskontrolle, stimulierte HUVECs als Positiv-Referenz.

4.1.1. SCF-Expression unter Bestrahlung - Keine Veränderung in den untersuchten Zelllinien

Für die NSCLC-Zelllinie A549 ist eine strahleninduzierte Zunahme der SCF-Expression beschrieben (Kamlah *et al.*, 2011). Ob ähnliches auch für die hier ausgewählten Zelllinien zutrifft, ist nicht bekannt. Daher wurden die für diese Arbeit untersuchten NSCLC-Zelllinien H23 und H226 ebenfalls hinsichtlich ihrer SCF-Expression nach Bestrahlung untersucht.

Entsprechend 3.9.1 aufgearbeitete und mit 2 und 6 Gy bestrahlte Proben wurden 24 h nach Bestrahlung gestoppt. Mittels qReal-Time RT-PCR Analyse wurde der mRNA-Gehalt ermittelt und als $-\Delta\text{Ct}$ -Wert in Abbildung 10 dargestellt.

Hierbei konnte keine veränderte SCF-Expression durch Bestrahlung in den beiden Zelllinien weder in 2D noch in 3D auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

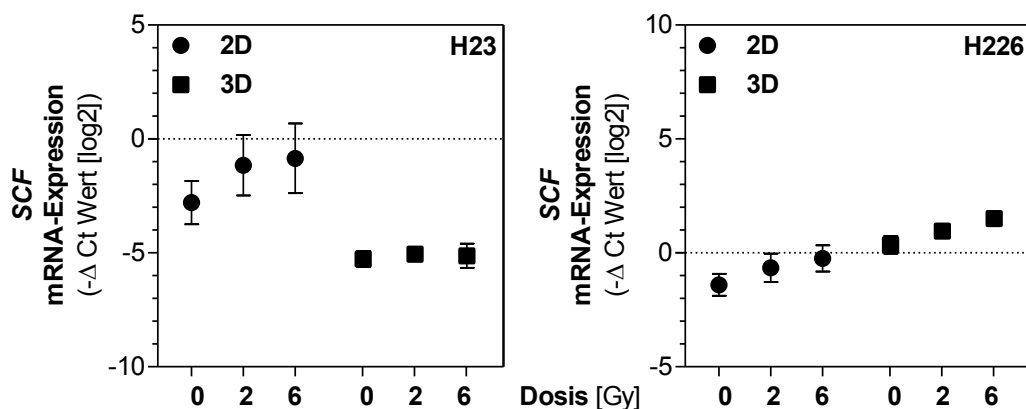


Abbildung 10: SCF-Expression der Zelllinien H23 und H226 24 h nach Bestrahlung mit 0, 2 und 6 Gy in 2D- und 3D-Kultur.

Keine Veränderung der SCF-Expression durch Bestrahlung in 2D- oder 3D-Kultur. Dargestellt sind die $-\Delta\text{Ct}$ -Werte, jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler; $n \geq 3$.

4.2. SCF-Inhibition mittels siRNA

Um die Effektivität der SCF-Inhibition durch Transfektion mit siRNA beurteilen zu können, wurde die SCF-mRNA-Expression transfizierter Zellen beider Zelllinien sowohl in 2D als auch in 3D mit Hilfe der quantitativen Real-Time RT-PCR ermittelt und mit der jeweiligen Kontrollgruppe (sicontrol, vgl. 3.3) verglichen.

Hierbei wurde die mRNA-Expression von SCF für die Zelllinie H23 in 2D im Mittel 4,5 Zyklen gesenkt, was bei einer angenommenen Effizienz von zwei einer mehr als 20-

fachen Expressionsabnahme entspricht. In 3D fand sich eine Abnahme von etwa 3,1 Zyklen.

Für H226 lag die mRNA-Expressionsabnahme bei 3,3 Zyklen in 2D, für 3D-Kulturbedingungen wurden 3,2 Zyklen gemessen. Dementsprechend kann von einer effektiven SCF-Ausschaltung ausgegangen werden.

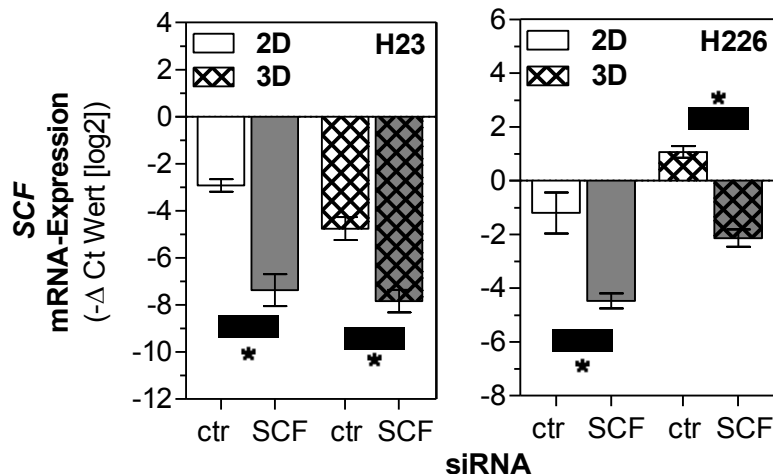


Abbildung 11: SCF-Expression der Zelllinien H23 und H226 24 h nach transienter Transfektion mit siRNA-SCF (SCF) und als Kontrolle siRNA-control (ctr) in 2D- bzw. 3D-Kultur.

In beiden Zelllinien sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultur signifikante Abnahme der SCF-Expression 24 h nach transienter Transfektion mit siRNA. Dargestellt sind die $-\Delta Ct$ -Werte, jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler; Bei der statistischen Auswertung mittels Student's t-Test wurde das Signifikanzniveau mit $ p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.*

4.3. Klonogenes Überleben unter Bestrahlung in 2D- und 3D-Kultur - Signifikanter Einfluss der Kulturbedingungen in beiden Zelllinien

Um einen grundlegenden Vergleich des klonogenen Überlebens der untersuchten Zelllinien unter verschiedenen Kulturbedingungen ziehen zu können, wurden die Zellen entsprechend 3.5 bestrahlt, ausgesät und die Überlebensfraktion bestimmt. Durch Anpassen der Kurven mittels des linear-quadratischen Modells erhielt man die in Abbildung 12 dargestellten Dosiseffektkurven.

Erwartungsgemäß zeigte sich in beiden Zelllinien eine Abnahme des zellulären Überlebens mit zunehmender Strahlendosis. H226 wies außerdem ein erhöhtes zelluläres Überleben und damit erhöhte Strahlenresistenz unter 3D-Kulturbedingungen

auf. Für H23 konnte unter diesen Bedingungen lediglich unter hohen Strahlendosen (8 Gy) ein signifikanter Anstieg des klonogenen Überlebens festgestellt werden. Für die Zelllinie H226 zeigte sich ein signifikanter Unterschied bereits bei niedrigeren Dosen.

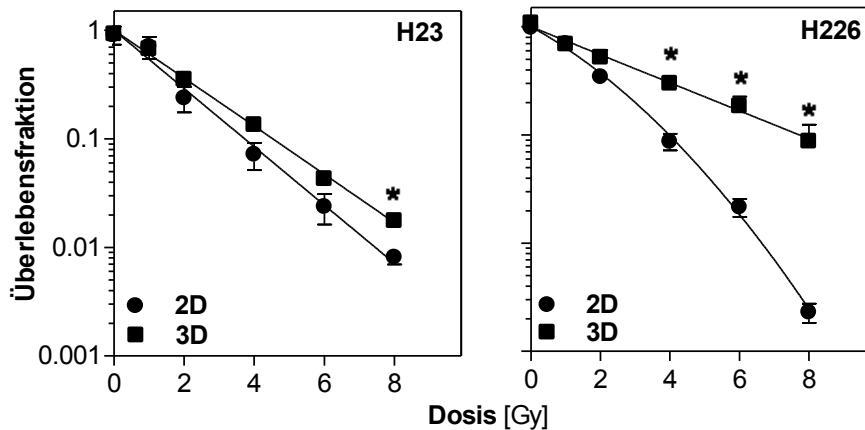


Abbildung 12: Klonogenes Überleben der Zelllinien H23 und H226 nach Photonenbestrahlung (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy) in 2D- und 3D-Kultur.

Abnahme des zellulären Überlebens mit zunehmender Strahlendosis beider Zelllinien. In 3D-Kultur signifikant erhöhtes Zellüberleben beider Zelllinien, für H226-Zellen deutlicher im Vergleich mit H23-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Überlebensfraktionen \pm Standardfehler und zugehörigen Kurven gefittet nach linear-quadratischem Modell ($\ln SF = -(\alpha D + \beta D^2)$); Bei der statistischen Auswertung mittels Students t-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.

4.4. Klonogenes Überleben unter SCF-Inhibition - Moderater Einfluss auf Plattierungseffizienz beider Zelllinien

Ob der SCF/cKit-Signalweg einen Einfluss auf das zelluläre Überleben der hier untersuchten Zellen hat, wurde wie folgt ermittelt:

Die Zellen wurden entsprechend 3.4 transfiziert und ihre Fähigkeit, Kolonien auszubilden unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen mittels Koloniebildungstest und Berechnung der PE (siehe 3.6.3) überprüft. Beim Vergleich mit nicht SCF-gehemmten Proben (ctr) konnte für die Zelllinie H23 eine signifikante Reduktion der Plattierungseffizienz unter 3D-Bedingungen gezeigt werden. Konventionell kultivierte und inhibierte Zellen zeigten dies nicht. Die H226-Zellen zeigten ein genau umgekehrtes Verhalten: Während unter 2D-Kulturbedingungen eine signifikante Abnahme der PE gezeigt werden konnte, fehlte dieser Effekt bei den in zellulärer Matrix kultivierten Zellen (Abbildung 13).

Ergebnisse

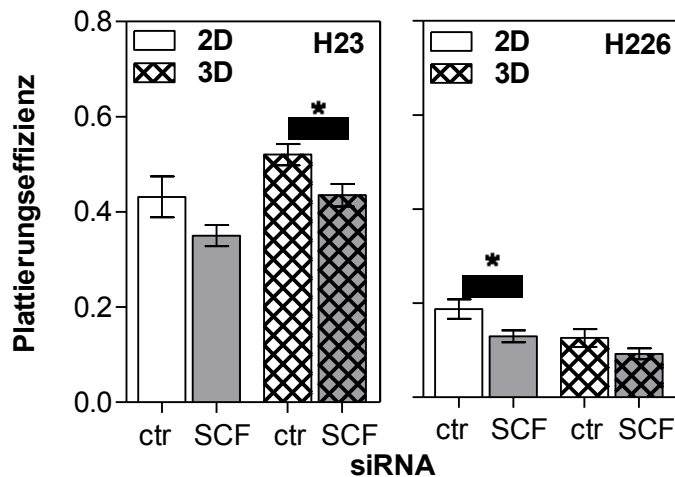


Abbildung 13: Plattierungseffizienz der Zelllinien H23 und H226 nach transienter Transfektion mit siRNA-SCF (SCF) und ungerichteter siRNA als Kontrolle (ctr) in 2D- und 3D-Kultur.

*Signifikante Veränderung des zellulären Überlebens nach Transfektion mit siRNA unter 3D-Kulturbedingungen der H23-Zellen. Unter 2D-Kulturbedingungen signifikante Reduktion der PE der H226-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Plattierungseffizienz \pm Standardfehler; Bei der statistischen Auswertung mittels Student's t-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.*

4.5. Klonogenes Überleben unter Bestrahlung und SCF-Inhibition - Kein Einfluss der Bestrahlung durch SCF

Es wurde weiter getestet, ob eine Photonenbestrahlung nach Inhibition von SCF eine veränderte Auswirkung auf das klonogene Überleben hat. Hierfür wurden die Zelllinien transfiziert, bestrahlt und die Überlebensfraktion mittels Koloniebildungstest (vgl 3.6) in 2D und 3D bestimmt. Verglichen wurden die mit dem linear-quadratischen Modell angepassten Dosiseffektkurven der gehemmten Gruppen mit nicht siRNA-SCF-inhibierten Kontrollgruppen (sicontrol; Abbildung 14).

Neben der erwarteten Reduktion des zellulären Überlebens in beiden Versuchsgruppen bei zunehmender Bestrahlungsdosis, zeigte sich keine Veränderung des klonogenen Lebens in der SCF-inhibierten Gruppe. Die bereits ohne SCF-Inhibition festgestellte Überlebenssteigerung der H226 Zellen unter 3D-Bedingungen war auch in diesem Versuchsaufbau zu beobachten.

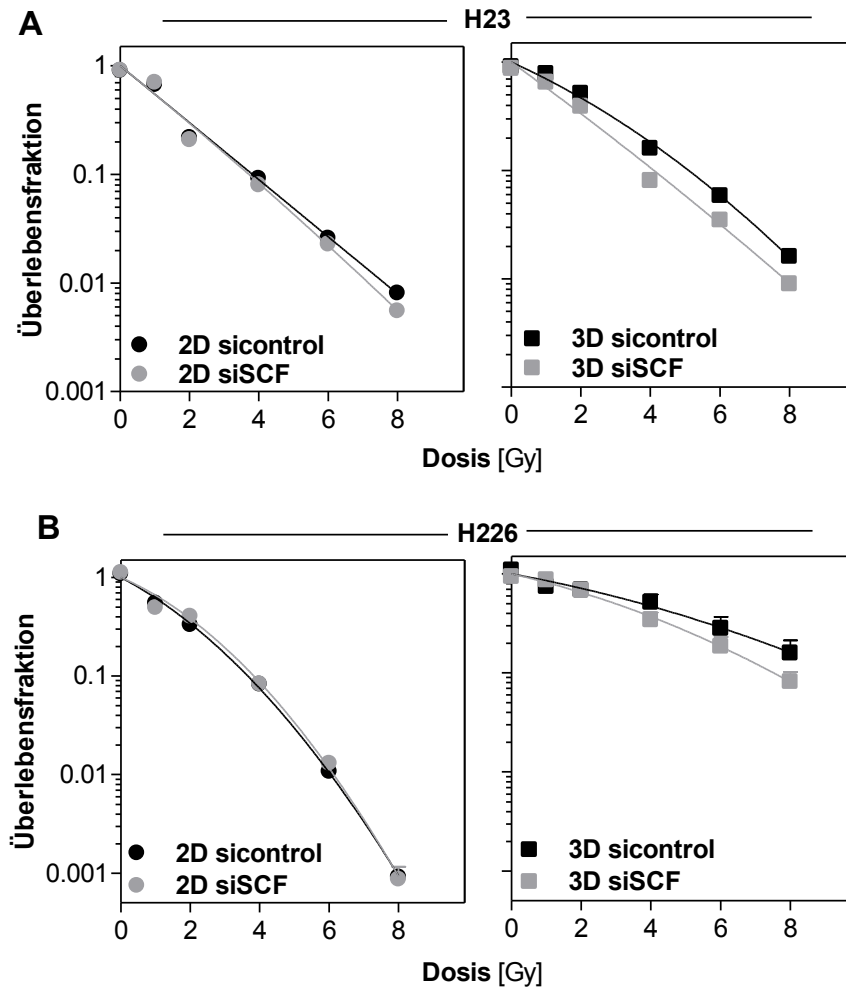


Abbildung 14: Klonogenes Überleben der Zelllinien H23 (A) und H226 (B) nach SCF-Hemmung mittels siRNA (siSCF versus Kontrolle [sicontrol]) und Photonenbestrahlung (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy) in 2D- und 3D-Kultur.

Kein verändertes zelluläres Überleben der untersuchten Zelllinien nach SCF-Hemmung mittels transienter Transfektion mit siRNA gegen SCF. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Überlebensfraktionen \pm Standardfehler und zugehörigen Kurven gefittet nach dem linear-quadratischen Modell ($\ln SF = -(\alpha D + \beta D^2)$); $n \geq 3$.

4.6. Einfluss von Kulturbedingungen auf das Invasionsverhalten der untersuchten Zelllinien

Im nun Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob SCF in Kombination mit Photonenstrahlung das Invasionsverhalten der ausgewählten Zelllinien beeinflusst. Als Marker der EMT (Thiery, 2003; Kalluri und Weinberg, 2009) und damit mögliche Ursache einer veränderten Zellbeweglichkeit wurden die Expression von Vimentin, N-Cadherin und E-Cadherin untersucht.

4.6.1. Invasionsverhalten in 2D- und 3D-Kultur - Kulturbedingungen beeinflussen Invasionsverhalten signifikant

Die Zelllinien wurden auf ihre Beweglichkeit hin im Invasionstest (3.7) untersucht. Dargestellt sind in Abbildung 15 die Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Kultur. Es zeigte sich, dass unter 2D-Bedingungen im Mittel 20% der H23- und 25% der H266-Zellen die Membran überquerten. In 3D war der Anteil der invadierenden Zellen mehr als doppelt so hoch: die Invasion lag im Mittel bei 47 % (H23) bzw. bei 52 % (H226). Demnach invadierten unter 3D-Bedingungen etwa die Hälfte aller ausgesäten Zellen.

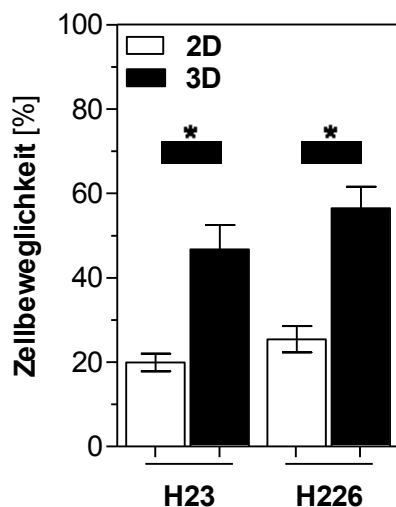


Abbildung 15: Invasionsverhalten für H23- und H226-Zellen in 2D- und 3D-Kultur.

*Anstieg der prozentualen Invasion beider Zelllinien in 3D-Kultur. Dargestellt ist die Zellbeweglichkeit in % als Mittelwert \pm Standardfehler; bei der statistischen Auswertung mittels Student's t-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.*

4.6.2. Expression EMT-assoziiierter Gene unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen - Signifikante Expressionsunterschiede

Als mögliche Ursache der in 3D beobachteten erhöhten Zellmotilität wurde ein EMT-ähnlicher Vorgang mit entsprechender Expressionsänderung der damit assoziierten Marker vermutet. Demensprechend wurden die Zellen auf eine veränderte Expression der EMT-spezifischen Gene Vimentin, N- und E-Cadherin untersucht.

Hierzu wurden die nach 3.8 generierten Proben mittels qReal-Time PCR 24 h nach Transfektion auf ihren mRNA-Gehalt von Vimentin, N- und E-Cadherin geprüft, und die Expression unter 2D-Bedingungen mit der in 3D-Matrix verglichen (Abbildung 16). Für alle untersuchten Gen-Expressionen konnte ein signifikanter Anstieg bzw. Abfall in 3D-Kultur gezeigt werden.

Ergebnisse

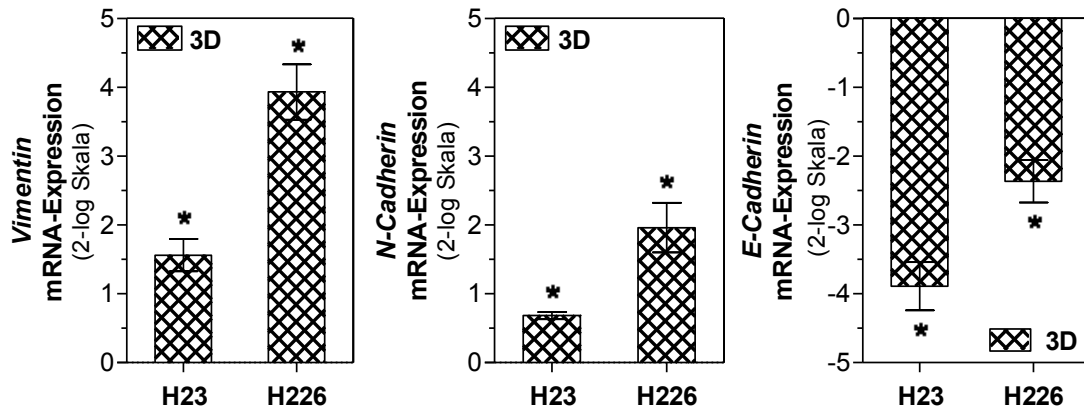


Abbildung 16: mRNA-Expression von Vimentin, N- und E-Cadherin in den Zelllinien H23 und H226 als 2-log-Verhältnis zwischen 2D- und 3D-Kultur.

Gesteigerte Expression von Vimentin und N-Cadherin und verminderte Expression von E-Cadherin in 3D-Kultur auf mRNA-Ebene. Dargestellt sind die mittels qRT-RT-PCR ermittelte $\Delta\Delta Ct$ -Werte als 2-log-Verhältnis zwischen 2D- und 3D-Kultur, jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler; bei der statistischen Auswertung mittels Student's *t*-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.

Auf Proteinebene wurde die Vimentin-Expression mittels Western Blott dargestellt und mit Hilfe der Densitometrie ein relativer Expressionsanstieg aufgezeigt.

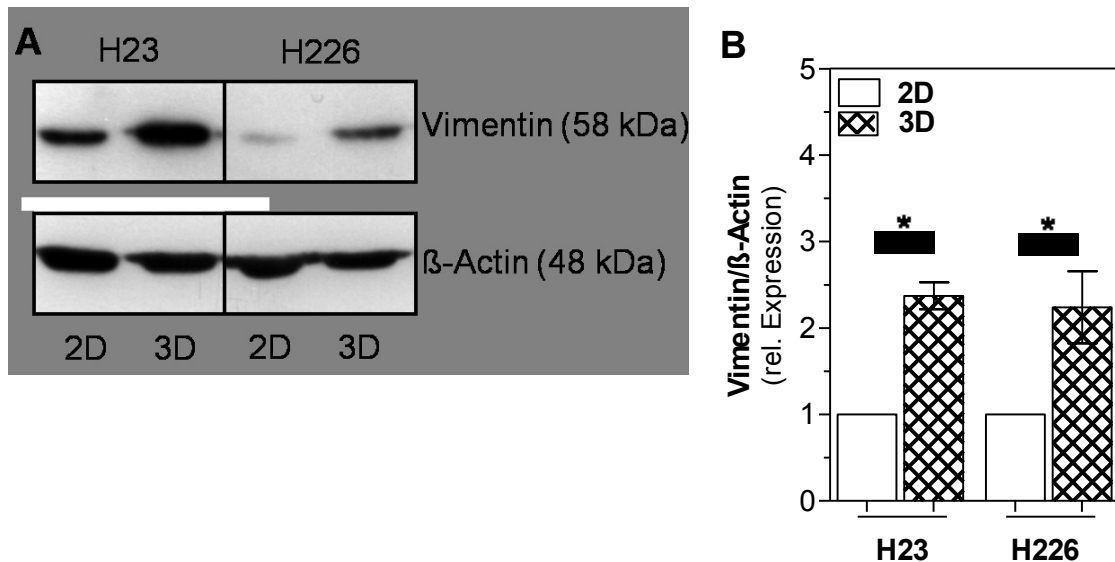


Abbildung 17: Proteinexpression von Vimentin in den Zelllinien H23 und H226 im Western-Blot (A) mit relativer Expression (Dosimetrie, B) bei Vergleich der in 2D- und 3D-kultivierten Zellen.

Gesteigerte Vimentin-Expression auf Proteinebene unter 3D-Kulturbedingungen für beide Zelllinien. Dargestellt sind die Proteinbanden von Vimentin (58 kDa) und β -Actin (48 kDa) als Ladungskontrolle, sowie die relative Proteinexpression nach Normalisation zu β -Aktin jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler; bei der statistischen Auswertung mittels Student's *t*-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.

4.7. Invasionsverhalten unter SCF-Inhibition in 2D und 3D - SCF beeinflusst Invasionsverhalten

Um den Einfluss von SCF/c-Kit auf die Zellbeweglichkeit, wie bereits *in situ* beschrieben (Kuonen, Secondini und Rüegg, 2012), *in vitro* untersuchen zu können, wurden die Zellen wie in 3.4 beschrieben transfiziert, die prozentuale Invasionszahl bestimmt und mit der nicht siSCF-transfizierten Gruppe (sicontrol) verglichen. Dieses Vorgehen wurde ebenfalls unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen durchgeführt.

Es konnte in 2D ein Rückgang der Zellbeweglichkeit nach SCF-Hemmung für beide Zelllinien gezeigt werden: Sie nahm bei den H23-Zellen im Mittel von 20% auf 11%, bei den H226 von 25% auf 17% ab (Abbildung 18). Dies entspricht einem Rückgang der Invasion um fast die Hälfte für die Zelllinie H23 bzw. um knapp ein Drittel bei den H226-Zellen.

Unter 3D-Kulturbedingungen war ein Rückgang im Mittel von 41% invadierender H23-Zellen auf 31% und für H266 von 57% auf 41% zu detektieren (Abbildung 18).

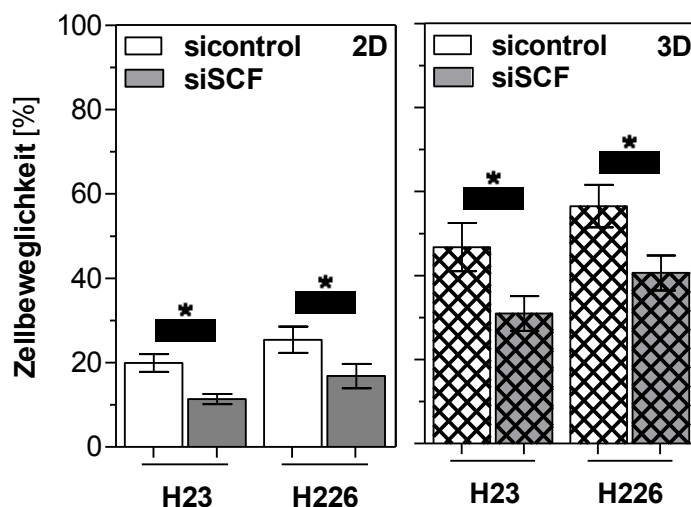


Abbildung 18: Invasionsverhalten der Zelllinien H23 und H226 nach SCF-Hemmung in 2D- und 3D-Kultur.

Verminderte Invasion der H23- und H226-Zellen nach SCF-Ausschaltung mittels siRNA sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultur. Dargestellt ist die Zellbeweglichkeit in % als Mittelwert \pm Standardfehler; bei der statistischen Auswertung mittels Student's *t*-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.

4.7.1. Expression EMT-assoziiierter Gene unter SCF-Inhibition - SCF beeinflusst Expression nicht

Ob die verringerte Invasion unter SCF-Ausschaltung ähnlich den Kulturbedingungen EMT-vermittelt sein könnte, wurde durch die Expressionsunterschiede der EMT-assoziierten Gene untersucht. Verglichen wurde die mRNA-Expression von Vimentin, E- und N-Cadherin nicht gehemmter mit siSCF-transfizierten Gruppen sowohl in 2D als auch in 3D.

Dabei zeigte keine der beiden Zelllinien, weder in 2D noch in 3D, eine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von Vimentin, N- oder E-Cadherin (Abbildung 19).

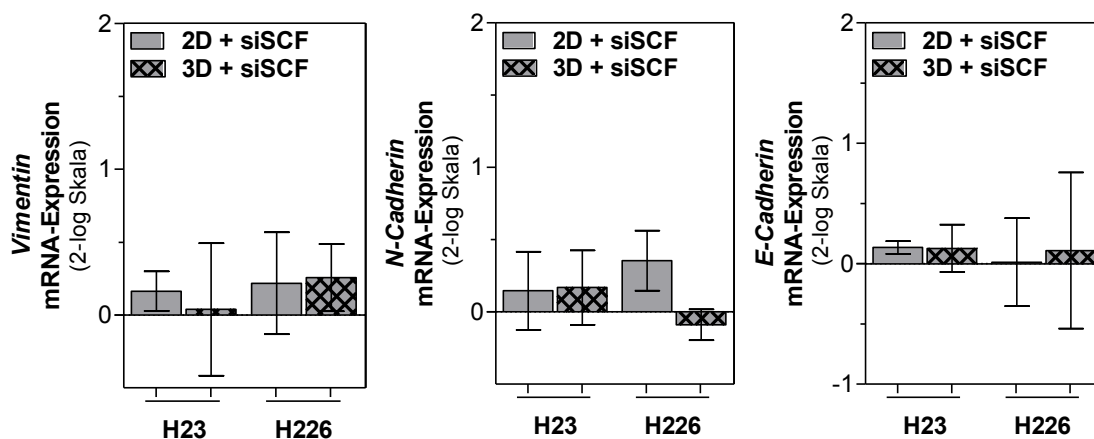


Abbildung 19: Expression von Vimentin, N- und E-Cadherin in den Zelllinien H23 und H226 unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen 24 h nach transienter Transfektion mit siRNA-SCF.

Keine veränderte mRNA Expression von Vimentin, E-Cadherin oder N-Cadherin in H23- und H226-Zellen nach SCF-Hemmung. Dargestellt sind die $\Delta\Delta Ct$ -Werte, jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler; bei der statistischen Auswertung mittels Student's *t*-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.

4.8. Invasionsverhalten unter Bestrahlung in 2D und 3D - Photonenstrahlung beeinflusst Zellbeweglichkeit nicht

Ein wie von Fujita et al. für Pankreaskarzinomzellen beschriebener Einfluss von Photonenstrahlen auf die Zellbeweglichkeit (Fujita et al., 2011) wurde auch für die hier verwendeten Zelllinien untersucht. Das Invasionsverhalten mit 2 und 6 Gy bestrahlter Zellen wurde mittels Invasionstest dargestellt.

Abbildung 20 zeigt, dass hierbei keine signifikante Veränderung der Zellbeweglichkeit zwischen den gewählten Dosen weder in 2D noch in 3D vorlag.

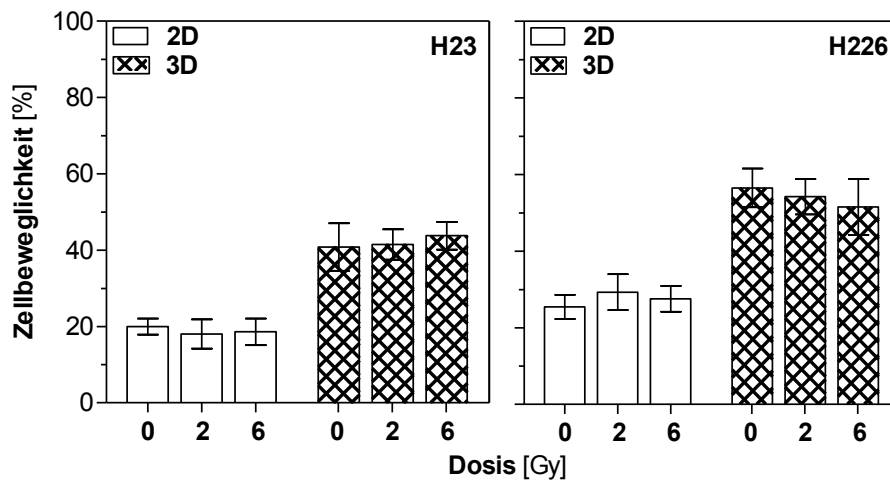


Abbildung 20: Invasionsverhalten der H23- und H226-Zellen nach Bestrahlung mit 0, 2 und 6 Gy in 2D- und 3D-Zellkultur.

*Kein Einfluss von Strahlung auf das Invasionsverhalten, weder in 2D noch in 3D. Dargestellt ist die Zellbeweglichkeit in % als Mittelwert \pm Standardfehler; bei der statistischen Auswertung mittels Student's t-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.*

4.8.1. EMT-assoziierte Gene unter Bestrahlung - Photonenstrahlung verändert Expression nicht

Entsprechend 3.9.1 aufgearbeitete und mit 2 und 6 Gy bestrahlte Proben wurden 24 h nach Bestrahlung gestoppt. Mittels qReal-Time RT-PCR Analyse wurde der mRNA-Gehalt ermittelt und als $\Delta\Delta C_t$ -Wert in Abbildung 21 dargestellt.

Hierbei konnte keine veränderte Expression der von mir gewählten EMT-assoziierten Gene Vimentin, E- und N-Cadherin durch Bestrahlung in den beiden Zelllinien weder in 2D noch in 3D auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

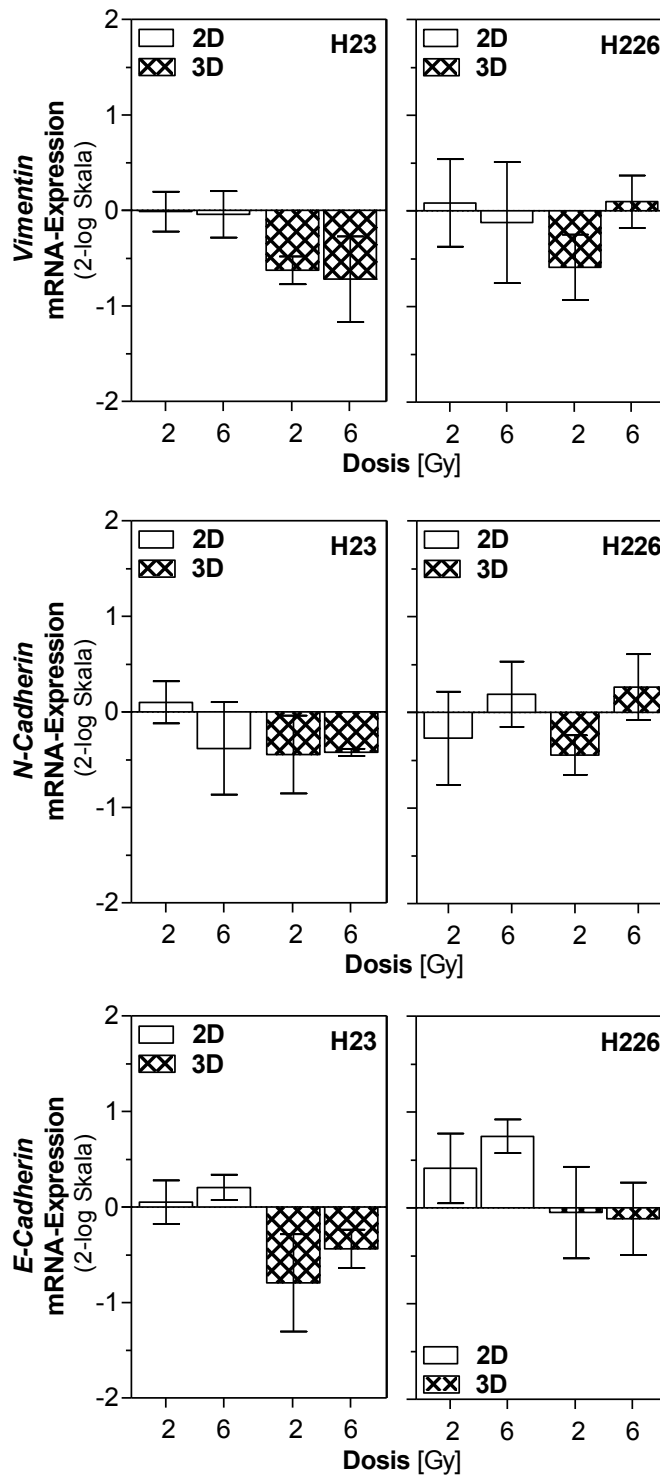


Abbildung 21: Expression EMT-assoziierter Gene der Zelllinien H23 und H226 24 h nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy in Bezug auf nicht bestrahlte Zellen in 2D- und 3D-Kultur.

Keine Veränderung der Vimentin-, E-Cadherin- und N-Cadherin-Expression durch Bestrahlung in 2D- oder 3D-Kultur. Dargestellt sind die $\Delta\Delta Ct$ -Werte, jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler; bei der statistischen Auswertung mittels Student's t-Test wurde das Signifikanzniveau mit $ p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.*

4.8.2. Invasionsverhalten unter SCF-Hemmung und Bestrahlung - SCF-Effekt auch unter Bestrahlung messbar und kein zusätzlicher Bestrahlungseffekt

Für diese Arbeit war es weiter von Interesse, ob der gezeigte SCF-bedingte Effekt auf das Invasionsverhalten durch Bestrahlung zusätzlich moduliert wird.

Dementsprechend wurden mittels siRNA transfizierte und nicht SCF-gehemmte Gruppen mit 2 und 6 Gy bestrahlt und auf einen Unterschied der Zellbeweglichkeit im Invasionstest hin überprüft.

Gezeigt werden konnte, dass die siSCF-behandelten Gruppen sowohl in 2D als auch in 3D im Vergleich zu den nicht mit siSCF-behandelten Gruppen nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy eine geringere Zellbeweglichkeit aufwiesen (Abbildung 22). Hierbei halbierte sich die Zahl der invadierenden H23-Zellen nach SCF-Hemmung in 2D nach 2 Gy Bestrahlung (von 18% auf 9%), während die Zahl der H226-Zellen unter diesen Bedingungen von 29% auf 23% absank. Unter Ausschaltung von SCF und Bestrahlung mit 6 Gy zeigten die Zellen in 2D-Kultur für H23 einen Rückgang von 19% invadierender Zellen auf 11%, für H226 von 28% auf 20%.

Unter 3D-Kulturbedingungen nahm die Zellbeweglichkeit der H23-Zellen im Mittel um 11,5% unter Bestrahlung ab, wobei sich nach 2 Gy eine Reduktion der Zellzahlen von 42% auf 33% und nach 6 Gy von 44% auf 30% fand.

Für die Zelllinie H226 war ähnliches in 3D-Kultur zu beobachten. Während ohne SCF-Hemmung nach 2 Gy Bestrahlung noch mehr als die Hälfte der Zellen die Membran durchquerten (Mittelwert 54%), waren es nach siSCF-Behandlung gerade noch ein Drittel der ausgesäten Zellen (Mittelwert 32%). Auch nach 6 Gy Bestrahlung lag im Mittel die Zahl der invadierenden, SCF-gehemmten Zellen 42% unter den nicht siSCF-behandelten.

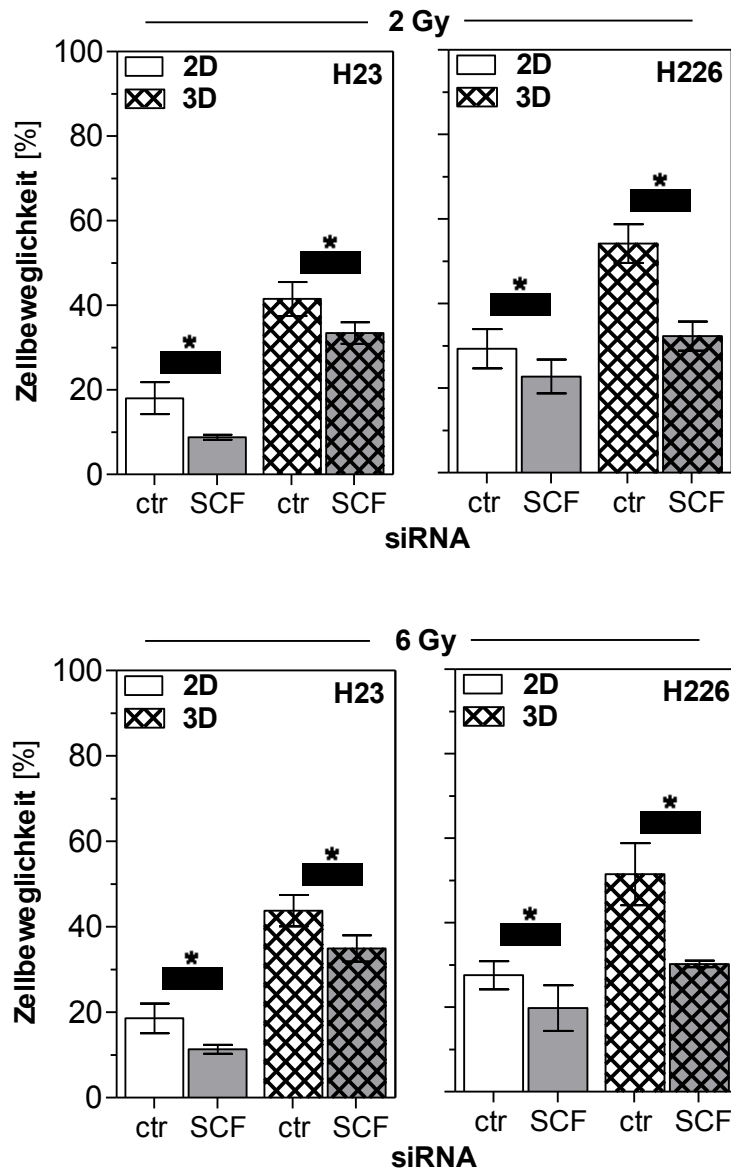


Abbildung 22: Invasionsverhalten der Zelllinien H23 und H226 nach SCF-Hemmung in 2D- und 3D-Kultur und nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy.

Verminderte Invasion der Zellen unter Bestrahlung mit 2 und 6 Gy nach siRNA-SCF Transfektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (ctr). Dargestellt ist die Zellbeweglichkeit in % als Mittelwert \pm Standardfehler; bei der statistischen Auswertung mittels Student's t-Test wurde das Signifikanzniveau mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet; $n \geq 3$.

5. Diskussion

Die Tyrosinkinase c-Kit wird durch die Bindung ihres Liganden Stem Cell Factor (SCF) aktiviert. Hierdurch werden über verschiedene Signaltransduktionskaskaden elementare Regulationsmechanismen beeinflusst, die sich auf das Überleben sowie das Migrations- und Proliferationsverhalten der rezeptortragenden Zellen auswirken. Neben seiner physiologischen Bedeutung kommt dem SCF/c-Kit-Signalweg auch in Tumorzellen eine wichtige Rolle zu (Lennartsson und Rönstrand, 2012). Hierbei kann eine c-Kit-Aktivierung zur Tumorentstehung führen oder maßgeblich eine Progression des Tumors bedingen (Pittoni *et al.*, 2011).

Die Hemmung dieses Signalweges stellt demnach einen effektiven Ansatzpunkt für eine spezifische Tumorthherapie dar, die mittels Tyrosinkinaseinhibitoren, initial Imatinib, bereits realisiert werden konnte (Buchdunger *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Krystal *et al.*, 2001; Carlino, Todd und Rizos, 2014; Iqbal und Iqbal, 2014). Klinisch findet diese gezielte Therapie bereits eine breite Anwendung (Müller-Tidow *et al.*, 2007). Untersuchungen von Donnerberg *et al.* legen nahe, dass auch c-Kit-positive NSCLC-Tumoren auf Imatinib ansprechen könnten (Donnerberg *et al.*, 2012). Für die NSCLC-Zelllinie A549 wurde eine strahleninduzierte SCF-Expressionssteigerung beschrieben und nach spezifischer SCF-Hemmung in Kombination mit Photonenbestrahlung konnte eine Abnahme der Tumorangiogenese gezeigt werden (Kamlah *et al.*, 2011). Weitere Arbeiten legen eine SCF/c-Kit-induzierte Strahlenresistenz verschiedener maligner Zellen nahe (Maddens *et al.*, 2002; Perez-Losada *et al.*, 2003). Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass eine Kombination aus Hemmung des SCF/c-Kit-Signalweges in Kombination mit Bestrahlung eine geeignete Therapieoption c-Kit-exprimierender Zellen darstellen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des SCF/c-Kit-Signalweges auf die Strahlenempfindlichkeit und das Invasionsverhalten der NSCLC-Zelllinien H23 und H226 *in vitro* unter 2D- und 3D-Zellkulturbedingungen zu untersuchen und damit einen möglichen Ansatzpunkt zur Therapieoptimierung, insbesondere beim Einsatz von Strahlentherapie von NSCLCs zu finden.

5.1. Unterschiede in der SCF- und c-Kit-Expression der gewählten NSCLC-Zelllinien

Um einen möglichen Effekt von SCF und c-Kit untersuchen zu können, galt es initial herauszufinden, inwiefern Ligant und Rezeptor von den ausgewählten Zelllinien exprimiert werden. Durch Bestimmung der mRNA-Level mittels qRT-RT-PCR und der Proteinexpression im Westernblot konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien SCF und c-Kit unterschiedlich stark exprimieren (Abbildung 8 und 9). Dies ist auch für andere NSCLC-Zellen beschrieben: Pietsch *et al.* untersuchten gesundes Lungengewebe und NSCLC-Zellen aus Primärtumoren und Metastasen immunhistochemisch. Hierbei konnten in 30% der Adenokarzinomen, in 15% der Plattenepithelkarzinomen und 40% der undifferenzierten Karzinomen c-Kit nachgewiesen werden. Für SCF lag der Prozentsatz bei 58% (Adenokarzinome), 37% (Plattenepithelkarzinome) und 30% (undifferenzierte Karzinome) (Pietsch *et al.*, 1998). Die von uns analysierten H226-Zellen wiesen einen hohen SCF-m-RNA-Gehalt auf, ähnlich der Referenzprobe. Hingegen lag die c-Kit Expression 12 Zyklen, bei einer Effizienz von 2 etwa 24fach unterhalb der Referenzprobe. Hierzu passend ließ sich auch auf Proteinebene im Vergleich zur SCF-stimulierten Positivkontrolle (HUVECs) keine eindeutige Expression erkennen. Indessen zeigten die H23-Zellen im Vergleich zur Referenzprobe (HUVECs) und den H226-Zellen einen sehr niedrigen Expressionsgehalt für SCF. C-Kit wurde hingegen auf mRNA-Ebene in ähnlich hohen Konzentrationen wie in den HUVEC-Zellen exprimiert, während der Nachweis auf Proteinebene geringer ausfiel. Ähnliches konnte auch für die Zelllinie H520 gezeigt werden (Eberle *et al.*, 2017). Es liegt also nahe, dass der c-Kit-Gehalt nicht allein durch Transkription, sondern auch durch post-translatorische Prozesse bestimmt wird. Dieses heterogene Expressionsverhalten konnten wir auch im Rahmen einer weiterführenden Arbeit für weitere fünf NSCLC-Zelllinien und drei Prostatakarzinomzellen zeigen (Eberle *et al.*, 2017). Ähnliche Beobachtungen finden sich in der Literatur auch für Pankreas- (Yasuda *et al.*, 2006), andere NSCLC- (Pietsch *et al.*, 1998; Yoo *et al.*, 2004) und weitere Prostatakarzinomzellen (Mainetti *et al.*, 2015). Ein direkter Zusammenhang zwischen SCF- und c-Kit-mRNA-Leveln konnte nicht gezeigt werden (Eberle *et al.*, 2017). Dies lässt vermuten, dass eine Regulation des SCF/c-Kit-Signalweges unabhängig über beide Komponenten erfolgt. Diese Daten unterstützen die von Lennartsson und Rönstrand aufgestellte Vermutung, dass es sich bei der Fehlaktivierung des SCF/c-Kit-Signalweges in menschlichen Tumoren um einen sehr komplexen und vielschichtigen Prozess handelt, der keinem stringenten Schema folgt (Lennartsson und Rönstrand, 2012).

Während sich die Expressionslevel von SCF und c-Kit in den untersuchten Zelllinien deutlich unterschieden, ließ sich kein signifikanter Expressionsunterschied einer Zelllinie unter verschiedenen Kulturbedingungen beobachten. Im Einklang hiermit stehen die Ergebnisse fortgeführter Untersuchungen weiterer NSCLC-Zelllinien (Eberle *et al.*, 2017).

In zahlreichen Studien konnte ein im Vergleich zu 2D in 3D verändertes Genexpressionsmuster gezeigt werden. So sind beispielsweise Brustdrüsenepithelzellen ausschließlich unter 3D-Kulturbedingungen in der Lage Milchproteine zu exprimieren und sekretieren (Streuli, Bailey und Bissell, 1991; Streuli *et al.*, 1995). Grundlage dieser veränderten Expressionsmuster stellen sich gegenseitig beeinflussende Integrin- und hormonell vermittelte und durch Proteine der EZM gesteuerte Signalwege sowie Wechselwirkungen zwischen Zellkernmatrix und EZM dar (Bissell, Hall und Parry, 1982; Roskelley, Desprez und Bissell, 1994; Streuli *et al.*, 1995; Weaver *et al.*, 1997; Lelièvre *et al.*, 1998; Bissell *et al.*, 1999). Meine Daten legen nahe, dass die Expression von SCF und c-Kit hiervon weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Hingegen ist in der Literatur eine strahleninduzierte SCF-Expressionssteigerung nach Photonenbestrahlung in den humanen NSCLC-Zellen A549 beschrieben (Kamlah *et al.*, 2011). Entgegen diesen Beobachtungen zeigen die von mir untersuchten Zelllinien keine signifikante Änderung der SCF- oder c-Kit-mRNA-Expression, weder in 2D- noch in 3D-Kultur (Abbildung 10). Somit scheint eine wie von Kamlah *et al.* für die NSCLC-Zelllinie A549 beschriebene strahleninduzierte SCF-Expressionssteigerung ebenfalls Zelllinien spezifisch (Kamlah *et al.*, 2011). Da ich diese Beobachtungen sowohl in der SCF-reichen Zelllinie (H226) als auch in einer Zelllinie, die wenig SCF exprimiert, machen konnte, scheint eine spiegelabhängige Expressionssteigerung ebenso abwegig.

Bezüglich der von mir untersuchten Zellen wäre eine immunhistologische Betrachtung bezüglich der c-Kit-Expression interessant. Hierüber wäre eine Einteilung in c-Kit-positive und negative NSCLC-Tumoren möglich (Pelosi *et al.*, 2004). Die festgestellten niedrigen Expressionslevel könnten hier eine "negative" Zuordnung vermuten lassen. Jedoch könnten, angelehnt an die Erkenntnisse von Donnerberg *et al.* 2012, die mittels Durchflusszytometrie auch in immunhistochemisch "negativen" Tumorgewebe c-Kit-positive Zellen nachweisen konnten, ebenfalls c-Kit-positive Zellen detektiert werden und so die hier gemessenen Expressionslevel erklären.

5.2. Klonogenes Überleben der untersuchten Zelllinien

5.2.1. Kulturbedingungen verändern die Strahlenempfindlichkeit

Genotoxische Einflüsse, wie ionisierende Strahlung, schädigen über unterschiedliche Mechanismen die proliferative Integrität von (Tumor-)Zellen (Herrmann, Baumann und Dörr, 2006). Ich konnte mit meinen Experimenten zeigen, dass die Kulturbedingungen maßgeblich Einfluss auf die proliferative Integrität und damit die Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Zelllinien nahmen (Abbildung 12). Hierbei überlebten in 3D-Kultur signifikant mehr der H226-Zellen nach Bestrahlung. Auch für H23-Zellen konnte ein signifikant höheres klonogenes Überleben bei hohen Strahldosen demonstriert werden. Das Wachstum in 3D-Kultur bedingt demnach einen klaren Anstieg der Strahlenresistenz der untersuchten Zellen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine erhöhte Strahlenresistenz von 3D-kultivierten Zellen beschrieben (Eke *et al.*, 2009; Hehlhans *et al.*, 2009; Storch *et al.*, 2010) und den von uns in einer weitergeführten Studie erhobenen Daten, die diese Resistenzentwicklung für weitere NSCLC-Zellen und eine Prostatakarzinomzelllinie bestätigten (Eberle *et al.*, 2017). Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist abhängig von Reparaturfähigkeit, Zellzyklusphase, Sauerstoffversorgung und Zell-Matrix-Interaktionen (Cordes und Meineke, 2003; Hall und Giaccia, 2011). Zellen, die in Verbindung mit Proteinen einer EZM stehen, zeigten nicht nur unter zytotoxischen Substanzen wie Doxorubicin und Melphalan (Damiano *et al.*, 1999), sondern auch unter ionisierender Strahlung ein weitaus höheres Überleben als Zellen ohne Adhäsion zur EZM (Cordes und Van Beuningen, 2003; Cordes, 2006). Diese Resistenzentwicklung wurde auch für Tumorzellen gezeigt und als zelladhäsionsvermittelte Strahlen- (*cell adhesion-mediated radiation resistance, CAM-RR*) oder Chemoresistenz (*cell adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR*) bezeichnet (Damiano *et al.*, 1999; Cordes und Meineke, 2003; Sandfort, Koch und Cordes, 2007). Die Kontaktstelle zwischen Zelle und EZM stellen hierbei Adhäsionsmoleküle dar. Vor allem adhärieren die Zellen an der EZM über Integrine. Sie vermitteln zahlreiche Wechselwirkungen zwischen Zellinnerem und der Umgebung und regulieren so essenzielle zelluläre Vorgänge wie Differenzierung, Proliferation und Überleben (Giancotti und Ruoslahti, 1999; Hynes, 2002). Über Multiproteinkomplexe stehen sie ebenfalls in Verbindung mit Teilen des Zytoskeletts und damit in Wechselwirkung mit der nukleären Matrix (Zhang *et al.*, 2001; Berrier und Yamada, 2007; Xu, Boudreau und Bissell, 2009), wodurch die Regulation der Genexpression möglich erscheint (Nelson und Bissell, 2006; Xu, Boudreau und Bissell, 2009). Die naheliegende Schlussfolgerung, dass Integrine an der Ausbildung von Resistenzen gegenüber schädlicher Noxen wie Strahlung beteiligt sein könnten, wurde in

zahlreichen Studien gezeigt. So veränderte sich das Expressionsmuster bestimmter Integrine verschiedenster humaner Zelltypen sowie Tumorzellen nach Bestrahlung (Cordes *et al.*, 2002, 2003; Cordes und Meineke, 2003; Meineke *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2005). Hingegen konnte eine Strahlensensibilisierung nach siRNA-vermittelter Integrin-Expressions-Ausschaltung beobachtet werden (Cordes *et al.*, 2006; Estrugo *et al.*, 2007). Eine reduzierte Strahlenempfindlichkeit zeigten wiederum Tumorzellen, die in Laminin- oder Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden (Cordes *et al.*, 2002, 2003; Eke *et al.*, 2006). Da unter 3D-Bedingungen kultivierte Zellen im Vergleich zu Monolayer-Kulturen von allen Seiten mit Matrix umgeben sind, ergibt sich hier die Möglichkeit der Integrin-vermittelten Matrix-Zell-Interaktion an der gesamten Zelloberfläche (Larsen *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass in 3D-Kultur gewachsene Fibroblasten neben veränderten Integrinuntereinheiten der Zelloberfläche auch eine Veränderung der Signaltransduktion via Integrine aufwiesen (Cukierman *et al.*, 2001; Cukierman, Pankov und Yamada, 2002; Larsen *et al.*, 2006). Dass eine veränderte Genexpression ebenfalls die Strahlenempfindlichkeit beeinflusst, zeigen vergleichende Studien zwischen strahlensensiblen und -resistenten Zellen. So konnte für die als strahlenresistenter geltende NSCLC-Zelllinie A549 eine höhere Expression von Genen wie p53 und Bcl-2 im Vergleich zu der als strahlensensiblen SCLC-Zelllinie NCI-H446 gezeigt werden (Guo *et al.*, 2005). Diese Gene beeinflussen maßgeblich Zellteilungszyklus und Apoptose und begünstigen so das zelluläre Überleben. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit vergleichenden cDNA Microarray-Analysen anderer Forschungsgruppen (Sklar, 1988; Biard *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1999; Ogawa, Murayama und Mori, 2007). Gou *et al.* konnten weiter in den resistenteren A549 Zellen eine erhöhte Expression von Genen identifizieren, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Guo *et al.*, 2005). Basierend auf diesen Erkenntnissen, könnte auch eine veränderte Genexpression die von mir beobachtete Abnahme der Strahlenempfindlichkeit der Zelllinien H23 und H226 unter 3D-Kulturbedingungen erklären.

Bezüglich einer weiteren wichtigen Einflussgröße der zellulären Strahlenempfindlichkeit, der Anzahl radiogener DSB, ist bekannt, dass eine Korrelation zwischen dem klonogenen Überleben und der Anzahl residueller DSB (rDSB) besteht, demnach eine hohe Anzahl an rDSB eine Strahlensensibilisierung bewirkt und umgekehrt (Wurm *et al.*, 1994; Dikomey *et al.*, 1998; Brammer und Dikomey, 2000; Kasten-Pisula, Tastan und Dikomey, 2005). Es konnte für NSCLC-Zellen (A549) und Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Zunge (UTSCC-15) gezeigt werden, dass diese, wenn sie unter 3D-Kulturbedingungen wuchsen, signifikant weniger rDSB sowie letale Chromosomenfragmente aufwiesen als in Monolayer-Kultur, und weiter auch hier eine

wie oben beschriebene Korrelation zwischen rDSB und klonogenem Überleben besteht (Storch, 2010). Bei Betrachtung der Reparaturkinetik der strahleninduzierten DSB anhand der Anzahl gamma-H2AX/53BP1-positiver Foci nach Bestrahlung mit 1 Gy zu verschiedenen Zeitpunkten, zeigte sich diese unabhängig der Wachstumsbedingungen vergleichbar, während signifikant weniger DSB 0,5 h nach Bestrahlung in den 3D-Zellen gemessen wurden. Da auch in der Literatur eine Korrelation zwischen strahleninduzierter DSB und Strahlensensibilität beschrieben ist (Radford, 1985; Peacock *et al.*, 1992; Ruiz de Almodóvar *et al.*, 1994; El-Awady, Dikomey und Dahm-Daphi, 2003), schlussfolgerte Storch, dass die in 3D-Kultur gewachsenen Zellen beobachtete Resistenzentwicklung gegen Photonenstrahlung auf die verringerte Zahl strahleninduzierter DSB zurückzuführen sein könnte. Einen Unterschied der Zellzyklusverteilung zwischen 2D- und 3D-kultivierten Zellen, der 24 h nach Bestrahlung beobachtet werden konnte, schloss die Autorin als Ursache für die wesentlich höhere Strahlenresistenz 3D-kultivierter Zellen, aufgrund einer Angleichung und gleicher Anteile strahlenempfindlichen G2-Phase Zellen in 2D und 3D, aus (Storch, 2010). Hingegen ist der Einfluss der Chromatinstruktur auf die Strahlenempfindlichkeit in der Literatur beschrieben (Barone *et al.*, 1989; Ruiz de Almodóvar *et al.*, 1994; Woudstra *et al.*, 1998). Je nach Kondensierungsgrad kann diese in Heterochromatin (HC) oder Euchromatin (EC) differenziert werden (Grewal und Jia, 2007). Während jedoch einige Autoren eine weniger effiziente Reparatur radiogener DSB im kondensierten Chromatin aufgrund erschwerter Zugänglichkeit für Proteine zur DNA-Reparatur durch die dichter gepackte Molekularstruktur des HC als ursächlich für eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit sehen (Cowell *et al.*, 2007; Karagiannis und El-Osta, 2007; Kim *et al.*, 2007), konnten Storch *et al.* in den wesentlich strahlenresistenteren 3D-kultivierten Zellen eine stärkere Chromatinkondensation im Vergleich zu Monolayer-Kultur-Zellen detektieren (Storch *et al.*, 2010). Weiter wurde gezeigt, dass 0,5 h nach Bestrahlung die DSB-Induktion weitaus geringer ausfiel, je höher der Anteil an HC in den Zellen war. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte daraus, dass die in 3D gemessene erhöhte Chromatindichte als eine Art Schutz fungiert, die die verminderte Strahlenempfindlichkeit der in Matrix kultivierter Zellen hervorzurufen scheint. Auch konnte gezeigt werden, dass die Reparatur von HC-Foci, also im Heterochromatin gemessene strahleninduzierte DSB, in 3D wesentlich langsamer abläuft als in EU-Foci, was auch Goodarzi *et al.* beschreiben (Goodarzi *et al.*, 2008). Während ab 4 Gy in 2D-kultivierten Zellen ein deutlicher Dosiseffekt nachweisbar war, sich das bei unbestrahlten und bei niedrigen Dosen gemessene Verhältnis zwischen HC- und EC-Foci von annähernd 1:2 hin zu mehr EC-Foci verschob, blieb das Verhältnis in 3D-Zellen auch nach 24 h unverändert bei einer 1:1 Verteilung. Vergleichbar verhielt sich

die HC-EC-Verteilung in mit 4 Gy bestrahlten A549-Xenograft-Tumoren, also *in vivo*. So konnte festgehalten werden, dass unter 3D-Bedingungen die Zellen insgesamt weniger rDSB aufwiesen, diese jedoch im Vergleich zu Monolayer-kultivierten Zellen vermehrt im Heterochromatin lagen. In Anbetracht der verminderten Strahlenempfindlichkeit in 3D-Kultur folgerten Storch et al, dass die Gesamtzahl der rDSB ausschlaggebend für die Strahlenresistenzentwicklung sei, und nicht die Position der DSB (Storch et al., 2010).

Im Bezug auf meine Daten fiel auf, dass die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie H226, die wesentlich mehr SCF exprimiert als die Adenokarzinomzellen H23, eine wesentlich höhere Strahlenresistenz unter 3D-Kulturbedingungen entwickelte. Ähnlich verhielten sich die von uns in einer weiterführenden Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen H520 (Eberle et al., 2017). Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass eine Kultivierung in 3D-Kultur für Plattenepithelkarzinomzellen im Vergleich zu Adenokarzinomzellen günstigere Bedingungen bietet als Monolayer-Kulturen.

5.2.2. Die SCF-Inhibition hat nur einen untergeordneten Effekt auf das klonogene Überleben und die Strahlenempfindlichkeit

1992 zeigten Zsebo et al. eine SCF-bedingte Strahlenresistenz in Mäusen, die auch in Tumorzellen untersucht wurde (Zsebo et al., 1992). Die Datenlage diesbezüglich variiert jedoch enorm, so dass bei einer Modulation des SCF/c-Kit-Signalweges in unterschiedlichen Tumor-Zelltypen keine bis starke Effekte beschrieben wurden (Shui et al., 1995; Maddens et al., 2002). Um einen möglichen Einfluss auf die von mir gewählten NSCLC-Zellen untersuchen zu können, entschieden wir uns für eine SCF-Inhibition mittels siRNA. Hierbei wird *small interfering RNA* (siRNA) mit Hilfe von Liposomen endozytiert und bewirkt intrazellulär die Inhibition der Ziel-mRNA (Elbashir et al., 2001). Dieses Verfahren zeigte sich als effektiv (siehe auch 4.2, Abbildung 11) und erwies sich auch unter Bestrahlung als stabil. Initial betrachteten wir den reinen Effekt einer SCF-Inhibition auf das klonogene Überleben in 2D- und 3D-Kulturen der beiden Zelllinien ohne Bestrahlung. Hierbei zeigte sich, dass die wenig SCF-exprimierenden H23-Zellen nur in 3D-Kultur signifikant weniger Kolonien nach SCF-Hemmung bildeten. H226-Zellen zeigten dieses Verhalten lediglich in 2D-Kultur (Abbildung 13). Als nächstes galt es, den nur mäßigen SCF-Inhibitionseffekt auf die Plättierungseffizienz auch unter Bestrahlung zu betrachten, um einen direkten Einfluss des SCF/c-Kit-Signalweges auf die Strahlenempfindlichkeit der Zellen zu erörtern. In der Literatur findet sich im Hinblick auf eine Imatinib-vermittelte direkte Hemmung von c-Kit und anderen Tyrosinkinasen eine Strahlensenibilisierung für Glioblastom-Zellen beschrieben, jedoch nicht für die Brustkrebszelllinie BT20 und die Kolonkarzinomzell-

linie WiDr, die alle gleiche Protein-Expressionslevel von c-Kit aufwiesen (Holdhoff *et al.*, 2005). Ursächlich hierfür sehen die Autoren die effektive Hemmung eines autokrinen Loops der Tyrosinkinase PDGFR, schlossen einen Effekt auf bzw. durch c-Kit jedoch nicht aus. Ein möglicher strahlen-protektiver Einfluss von SCF, wie für menschliche Knochenmarks-Progenitorzellen beschrieben (Leigh *et al.*, 1994) konnten Shui *et al.* für SCLC-Zellen nicht bestätigen, da eine Behandlung mit SCF weder in c-Kit positiven noch in c-Kit negativen SCLC-Zellen zu einem Anstieg der Überlebensfraktion *in vitro* nach Bestrahlung führte. Auch in dieser Arbeit konnte keine veränderte Strahlenempfindlichkeit nach SCF-Inhibition festgestellt werden (Abbildung 14). Unter 3D-Kulturbedingungen zeigte sich lediglich ein Trend hin zu höheren Zellüberlebenszahlen. Anzuführen ist, dass ein relativ niedriges SCF-mRNA-Expressionslevel der H23-Zellen bereits einen nur geringen Einfluss auf zelluläre Vorgänge vermuten lässt. Da es zudem unter Bestrahlung nicht zum Anstieg der SCF-Expression gekommen war, schien ein relevanter Einfluss um so fraglicher, was letzten Endes im Hinblick auf eine Strahlensensibilisierung bestätigt werden konnte. Die H226-Zellen, die ca. 5-mal soviel SCF exprimieren (vgl. Abbildung 8), zeigten ebenfalls keinen strahlungsinduzierten Anstieg. Die Vermutung, dass eine gesteigerte SCF-Expression Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit nehmen kann, wurde jedoch in weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Eberle *et al.*, 2017). Hier konnte gezeigt werden, dass bei der Zelllinie H520, die SCF überexprimiert, eine signifikante Abnahme des klonogenen Überlebens nach SCF-Hemmung zu beobachten war. Diese Beobachtung könnte an eine SCF-abhängige Strahlenresistenz auch in Lungenkrebszellen denken lassen. Jedoch ist zusammenfassend zu sagen, dass dieser Signalweg durch seine heterogene Expression in NSCLC nur wenig bis keinen Einfluss auf die Strahlensensibilität zu nehmen scheint. Als Biomarker in Bezug auf das Überleben ist er demnach nicht geeignet.

5.3. Invasionsverhalten

Entscheidend für die Entstehung einer Metastase ist die Fähigkeit von Krebszellen den Primärtumor zu verlassen, sich anderorts "anzusiedeln" und sich dort weiter zu teilen. Insbesondere der erste Schritt, die Invasion, ist für die Metastasenbildung ausschlaggebend. Das Vorhandensein von Metastasen ist entscheidend für Therapiewahl und -erfolg. Der Strahlentherapie kommt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu, da sie gerade bei NSCLC-Tumoren in Patienten Anwendung findet, bei denen eine R0-Resektion, d. h. eine operative Entfernung des kompletten Tumorgewebes, nicht (mehr) möglich ist. Experimentell konnte gezeigt werden, dass

Bestrahlung die Tumorzellbeweglichkeit, Invasivität und damit die Fähigkeit zur Metastasierung induzieren bzw. fördern kann (Fujita *et al.*, 2011; Ogata *et al.*, 2011; Alexander und Friedl, 2012; Kuonen *et al.*, 2012). Bisher wurde hiermit eine Veränderung des Mikromilieus im bestrahlten Gewebe, auch als *tumor bed effect* bezeichnet, in Verbindung gebracht (Rofstad *et al.*, 2005; Kuonen, Secondini und Rüegg, 2012). Unter anderen scheint der SCF/c-Kit-Signalweg hierbei von Relevanz, denn es konnte gezeigt werden, dass es aufgrund gesteigerter SCF-Sekretion durch hypoxische Tumorzellen zu einer deutlichen Mobilisierung c-Kit-positiver Myeloidzellen des Knochenmarks kommt, die wiederum die Metastasierung des Primarius und bereits bestehender Metastasen fördern (Kuonen *et al.*, 2012).

Ob eine direkt an der Zelle verursachte Strahlenwirkung Einfluss auf das Invasionsverhalten von Tumorzellen nimmt, habe ich in dieser Arbeit an den ausgewählten NSCLC-Zelllinien unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht. Hierzu musste zunächst ein 3D-Invasionsmodell etabliert werden, dass den Zellen ein Wachstum in IrMatrix vor Beginn der Invasion über eine künstliche Basalmembran gewährleistet. Weiter wurde auch ein möglicher Einfluss des SCF/c-Kit-Signalweges durch Hemmung von SCF mittels siRNA analysiert.

5.3.1. 3D-Kulturbedingungen erhöhen die Zellbeweglichkeit der NSCLC-Zellen durch eine EMT-ähnliche Veränderung der Proteinexpression

Zur Etablierung eines 3D-Invasionsmodells wurden die Zellen nicht in regulärem Zellmedium (vgl. 3.7.1) sondern in 10%-iger laminin-reicher extrazellulärer Matrix in die Probeneinsätze ausgesät. So konnte bereits vor Überqueren der BM ein dreidimensionales Wachstum bewirkt werden (vgl. Abbildung 5: Schematische Darstellung der Invasions-Test-Kammern in 2D und 3D). Die Zellen zeigten in der IrMatrix in den Probeneinsätzen eine rundliche Morphologie vergleichbar der bereits etablierten 3D-Zellkultur.

Zunächst konnte ich zeigen, dass die Zellbeweglichkeit in beiden Zelllinien signifikant unter 3D-Kulturbedingungen zunahm (Abbildung 15). Diese Beobachtung demonstriert eindrücklich den Einfluss der Kulturbedingungen auf die Zellphysiologie. Ausgehend von bisherigen Erkenntnissen, dass die 3D-Matrix-Kultur physiologischere Wachstumsbedingungen schafft (Eke *et al.*, 2015), wäre dementsprechend eine signifikant höhere Zellbeweglichkeit und damit auch stärkere Invasivität der Zellen *in vivo* anzunehmen. Für beide NSCLC-Zelllinien könnte das gezeigte Verhalten darauf hinweisen, dass eine Monolayer-Kultur nicht die optimalen Wachstumsbedingungen darstellt, und damit in 2D-Kultur ermittelte Daten offensichtlich nicht die eigentlichen *in vivo* Verhältnisse abbilden.

Die Expressionssteigerung in 3D-Kultur für Vimentin und N-Cadherin sowie eine verminderte Expression von E-Cadherin auf mRNA-Ebene in beiden Zelllinien im Vergleich zu 2D-kultivierten Zellen (Abbildung 16) lässt an eine EMT-ähnliche Steigerung der Zellmotilität denken. Nach Kalluri und Weinberg handelt es sich bei EMT um vielfache biochemische Veränderungen von Epithelzellen, die dadurch einen mesenchymalen Phänotyp und eine gesteigerte Bewegungsfähigkeit erlangen (Kalluri und Weinberg, 2009). Insbesondere der E-Cadherin-Expression kommt in diesem Zusammenhang eine wichtige Bedeutung zu, Thiery bezeichnete es als "*one of the caretakers of the epithelial phenotype*"¹ (Thiery, 2002, S. 443). Das ist naheliegend, denn beispielsweise während der Gastrulation in Hühnern und Drosophila konnte eine verminderte E-Cadherin-Produktion beobachtet werden (Edelman *et al.*, 1983; Tepass *et al.*, 1996). Auch bei der Entwicklung des parietalen Endoderms der Maus ist der Produktionsverlust von E-Cadherin beschrieben (Burdsal, Damsky und Pedersen, 1993; Veltmaat *et al.*, 2000). Von Kalluri und Weinberg sowie anderen wurde EMT, die mit Implantation und embryonaler Entwicklung assoziiert ist, als Typ 1 EMT zusammengefasst (Thiery, 2002; Kalluri und Weinberg, 2009). Hierbei besteht ein Zusammenhang der intrazellulären Ausstattung und der extrazellulären Matrix, die das Migrationsverhalten der Zellen beeinflusst (Thiery *et al.*, 1988). So konnten Zoltan-Jones *et al* zeigen, dass Hyaluronsäure, unter anderen Bestandteil der EZM, in normalen Epithelzellen mesenchymale Eigenschaften induzieren kann (Zoltan-Jones *et al.*, 2003). Auch Wachstumsfaktoren wie TGF β , *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF) und SF/HGF (*scatter-factor/hepatocyte growth factor*) können über eine extrazelluläre Rezeptoraktivierung intrazelluläre Signalkaskaden triggern (Hay, 1995; Day *et al.*, 1999). Zu den Effektormolekülen, die eine Umorganisation des Zytoskeletts und die Auflösung bestimmter Zellkontakte bewirken, zählen die GTPasen Ras, Rho und Rac und einige SRC-Tyrosinkinasurezeptoren (Boyer *et al.*, 1997; Potempa und Ridley, 1998). Weiter werden hierdurch auch Regulatoren verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Vor allem Snail und Slug sind an der Genexpressionsregulierung EMT-typischer Veränderungen beteiligt.

Chen und Obrink gelang es L929-Zellen mit Plasmiden, die für Maus-E-Cadherin codieren, zu transfizieren. Zellen, die darauf eine stabile E-Cadherin-Expression aufwiesen, zeigten eine verminderte Invasivität *in vitro* (Chen und Obrink, 1991). Auch mit Antikörpern gegen E-Cadherin behandelte MDCK-Zellen (*Madin-Darby canine kidney epithelial cells*) zeigten invasives Verhalten in Kollagen-Gelen und Herzexplantaten (Behrens *et al.*, 1989). Diese Beobachtungen passen zu den von mir

¹ Übersetzung: "[...] einen der Hüter des epithelialen Phenotyps."

erhobenen Daten, dass H23 und H226 Zellen eine erhöhte Invasivität bei verminderter Expression von E-Cadherin in EZM-kultivierten Zellen zeigen. Des Weiteren stehen sie im Einklang mit weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die für die Plattenepithelkarzinomzelllinie H520 eine reduzierte Expression der EMT-assoziierten Gene Vimentin und N-Cadherin sowie einen Anstieg von E-Cadherin zeigte und eine verminderte Zellbeweglichkeit aufwies (Eberle *et al.*, 2016).

5.3.2. Der SCF/c-Kit-Signalweg beeinflusst das Invasionsverhalten unabhängig von EMT

Kuonen *et al.* konnten einen Zusammenhang des SCF/c-Kit-Signalweges und einer gesteigerten Zellmobilisierung von Myeloidzellen demonstrieren (Kuonen *et al.*, 2012). Ob ein direkter Einfluss des Signalweges auch für die von mir untersuchten NSCLC-Zellen *in vitro* besteht, wurde durch Ausschaltung von SCF mittels siRNA und Detektion der Zellbeweglichkeit untersucht. Abbildung 18 illustriert die signifikante Abnahme der Invasion nach SCF-Hemmung in beiden Zelllinien sowohl in 2D als auch in 3D. Interessanterweise konnte jedoch nach SCF-Knockdown keine veränderte Expression der EMT-assoziierten Gene Vimentin, E- und N-Cadherin festgestellt werden (Abbildung 19). Im Gegensatz zu den Kulturbedingungen kann hier also von einem EMT-unabhängigen Prozess ausgegangen werden. Die durch meine Beobachtungen gestützte direkte und EMT-unabhängige Wirkung der SCF/c-Kit-Achse findet sich in verschiedenen *in vitro* Studien belegt. Eine gesteigerte Invasion und Proliferation durch c-Kit-Aktivierung konnte bereits in kolorektalen Karzinomzellen (Bellone *et al.*, 1997, 2004) und SCLC-Zellen (Sekido *et al.*, 1993) demonstriert werden. Yasuda *et al.* detektierten Ähnliches in den c-Kit-mRNA-positiven Pankreaskarzinomzellen PAN-1 und SW1990, die durch Stimulation mit SCF eine gesteigerte Proliferation und Invasion zeigten (Yasuda *et al.*, 2006). Gestützt wurden diese Beobachtungen durch die Tatsache, dass mittels Imatinib-vermittelter c-Kit-Hemmung die Zellen weniger invasives Verhalten aufwiesen. Die c-Kit-negativen Zellen reagierten auf eine SCF-Stimulation dementsprechend nicht. Als hierbei beteiligte molekulare Mechanismen identifizierten Zhang *et al.* eine SCF-induzierte Akkumulation des Hypoxiefaktor HIF-1 α über den Ras/MEK/ERK- und PI3K/Akt-Signalweg und in diesem Rahmen eine vermehrte Expression der invasionsassoziierten Gene MMP-2 (*matrix metalloproteinase 2*), MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*), uPA (*Urokinase plasminogen activator*) und MT1-MMP (*Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase*) (Zhang *et al.*, 2011). Für die NSCLC-Zelllinie A549 wurde eine strahleninduzierte SCF-Steigerung aufgezeigt, und durch SCF-Hemmung konnte so eine verminderte Angiogenese induziert werden (Kamlah *et al.*, 2011). Während Kuonen *et al.* einen indirekten Einfluss des SCF/c-Kit-Signalweges

auf die Ausbildung von Metastasen über eine Mobilisierung c-Kit-positiver Myeloidzellen des Knochenmarks durch SCF-Sekretion hypoxischer Tumorzellen zeigen konnten (Kuonen *et al.*, 2012), demonstrieren meine Daten einen direkten Einfluss des Signalweges auf die Zellbeweglichkeit unabhängig der EMT.

5.3.3. Kein Einfluss auf das Invasionsverhalten durch Photonenbestrahlung

Fujita *et al.* konnten für zwei Pankreaskarzinomzelllinien eine EMT-assoziierte Steigerung der Invasion nach Bestrahlung nachweisen (Fujita *et al.*, 2011). Ähnliches ist für die humanen Fibrosarkomzellen HT1080 nach Photonenbestrahlung beschrieben (Ogata *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu stehen die von mir erhobenen Daten: Nach Bestrahlung konnte weder für H23 noch für H226 ein verändertes Invasionsverhalten festgestellt werden (Abbildung 20). In Einklang hiermit steht die fehlende strahlenabhängige Expressionsänderung EMT-assoziiierter Gene (Vimentin, E- und N-Cadherin; Abbildung 21). So kann angeführt werden, dass für die untersuchten NSCLC-Zelllinien Strahlung nicht als Auslöser einer EMT-vermittelten gesteigerten Invasivität zu werten ist. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Beobachtungen, dass auch in der NSCLC-Zelllinie A549 (Ogata *et al.*, 2011) und Glioblastomzellen (Eke *et al.*, 2012) nach Photonenbestrahlung keine Zellmotilitätssteigerung beobachtet werden konnte. Hingegen konnte für die A549-Zelllinie eine verminderte Invasivität nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen beobachtet werden (Ogata *et al.*, 2011). Da nach Kohlenstoffionenbestrahlung eine verminderte Akt-Phosphorylierung detektiert wurde, schlussfolgerten Ogata *et al.*, dass die Photonenbestrahlung im Gegensatz zu den Kohlenstoffionen über den PI3K/Akt-Signalweg maßgeblichen Einfluss auf die Fähigkeit der untersuchten Zellen, Metastasen auszubilden, nehme. Die Glioblastomzellen U87MG, A172, LN229 und U138MG zeigten unter keiner der beiden Strahlenarten eine Änderung ihres Invasionsverhaltens (Eke *et al.*, 2012). Der zuvor beschriebene Effekt, dass es nach SCF-Ausschaltung zu einer verminderten Zellbeweglichkeit kommt, ließ sich auch nach Bestrahlung detektieren (Abbildung 22). Ein Unterschied zur verminderten Beweglichkeit ohne Bestrahlung bestand nicht. In Zusammenschau der von mir erhobenen Daten und der Fachliteratur weisen die bisherigen Erkenntnisse darauf hin, dass ein Bestrahlungseffekt auf die Zellbeweglichkeit *auch in vitro* Tumorentitäten-abhängig ist, aber durch die Bestrahlung direkt nicht ausgelöst wird. Nur über RTK-Phosphorylierungen könnten Signalwege induziert werden, die wiederum die Zellmotilität steigern. Die Zahl der Einflussgrößen, die die Ausbildung einer Metastase bedingen können, ist enorm und verschiedenste Parameter wie auch Art und Dosis der applizierten Strahlung sind von Bedeutung (Ogata *et al.*, 2005, 2011; Eke *et al.*, 2012).

Eine effektive Therapie, um die Entstehung von Metastasen zu unterdrücken, stellt daher eine große Herausforderung dar und ist Gegenstand aktueller Forschung. Es konnte an Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden, dass eine SCF bedingte c-Kit-Aktivierung zur Hypoxie-unabhängigen Akkumulation des Transkriptionsfaktor HIF-1 α führt (Zhang *et al.*, 2011). Diese bedingte die Expressionssteigerung invasionsassoziiierter Gene. Zhang *et al.* schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass eine entscheidende Methode zur Tumorthherapie eine kombinierte Hemmung von c-Kit und HIF-1 α darstellen könnte. Die von mir in dieser Arbeit demonstrierte Strahlen- und EMT-unabhängige Motilitätssteigerung in Abhängigkeit des SCF/c-Kit-Signalweg legt nahe, dass diese Strategie unter Strahlentherapie effektiv sein könnte.

Zukünftige Studien sollten weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zum besseren Verständnis eine genauere Aufteilung in intra- und extrazelluläre Einflüsse zum Ziel haben. Hierbei sollten bei *in vitro* Versuchsaufbauten physiologischere 3D-Zellkulturmodelle gewählt werden.

6. Zusammenfassung

Die Metastasierung eines Tumors ist neben der lokalen Tumorkontrolle entscheidend für das Überleben eines Tumorpatienten. Der SCF/c-Kit-Signalweg ist häufig in Tumoren überexprimiert und beeinflusst Tumorentstehung, die Proliferation, die Migration sowie die Therapieresistenz. In dieser Arbeit sollte sowohl für eine 2D- als auch eine 3D-Kultur untersucht werden, welchen Einfluss dieser Signalweg auf die Strahlenempfindlichkeit der NSCLC-Zelllinien H23 und H226 hat und sich damit möglicherweise als Biomarker hierfür eignet. Des Weiteren wurde geprüft, ob ionisierende Strahlung die Invasionsfähigkeit dieser Tumorzellen, von der die Metastasierung ganz wesentlich bestimmt wird, beeinflusst. Methodisch wurde zur Beantwortung dieser beiden Fragestellungen die Strahlenempfindlichkeit mit Hilfe des Koloniebildungstestes ermittelt und die Invasionsfähigkeit mittels BioCoat™ Matrigel™ Assays gemessen.

Zwischen den untersuchten Adeno- (H23) und Plattenepithelkarzinom- (H226) Zelllinien bestand eine große Variation bezüglich des SCF- und c-Kit-Gehalts, der weder von Kulturbedingungen noch von ionisierender Strahlung beeinflusst wird. Im Vergleich zu einer 2D-Kultur zeigten die Zelllinien bei einer 3D-Kultivierung in Übereinstimmung mit der Literatur eine deutliche Radioresistenz. Eine Inhibition von SCF mittels spezifischer siRNA führte weder unter 2D noch unter 3D zu einer Radiosensibilisierung.

Hingegen konnte in beiden Zelllinien unter 3D-Kultivierung eine signifikant höhere Invasionsfähigkeit als unter 2D-Kultivierung demonstriert werden. Dies kann auf einen EMT-ähnlichen Vorgang zurückgeführt werden, denn die Zellen zeigten unter 3D-Bedingungen eine gesteigerte Expression von Vimentin, N-Cadherin und einen reduzierten Gehalt an E-Cadherin. Demnach nehmen die Zellen in 3D einen eher mesenchymalen Phänotyp an, wodurch ihre Invasionsfähigkeit erheblich gesteigert wird. EMT-unabhängig wurde durch eine Hemmung des SCF/c-Kit-Signalweges eine Abnahme der Invasionsfähigkeit in beiden Zelllinien festgestellt. Ionisierende Strahlen hingegen haben weder einen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit der untersuchten Zellen, noch beeinflussen sie die Expression EMT-assoziiierter Gene.

Meine Daten zeigen, dass generell eine Inhibition des SCF/c-Kit-Signalweges keine Radiosensibilisierung bewirkt. Daher scheint SCF nicht als Biomarker für eine effektive Strahlensensibilisierung beim NSCLC empfehlenswert. Weitere NSCLC-Zelllinien sollten dahingehend untersucht werden, um meine Vermutungen zu bestätigen.

Zusammenfassung

Ionisierende Strahlen haben bei den untersuchten NSCLC-Zellen keinen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit, die jedoch durch eine Inhibition des SCF/c-Kit-Signalweges gehemmt werden kann. Daher könnte gerade für metastasierende NSCLC diese Inhibition in Kombination mit Strahlentherapie eine sinnvolle Strategie darstellen, was klinisch zu beweisen wäre.

Zusammenfassend legen meine Daten nahe, dass für das NSCLC der SCF/c-Kit-Signalweg für die Metastasierung von großer Bedeutung ist, nicht jedoch für die Ausbildung einer Strahlenresistenz.

7. Summary

Survival of cancer patients depends on local tumor control and metastasis. The SCF/c-Kit pathway is often overexpressed in human tumors leading to an enhanced tumorigenesis, proliferation, migration and therapy resistance. In this work I analysed for the NSCLC cancer cell lines H23 and H226 growing under 2D and 3D culturing conditions whether the pathway influences radiosensitization and may be identified as a respective biomarker. It was also tested whether cancer cell motility determining metastasis is affected by X-irradiation. Therefore radiosensitization was measured using a colony formation assay. Cell motility was tested with BioCoat™ Matrigel™ Assays.

The tested adenocarcinoma (H23) and squamous-cell-carcinoma (H226) cell lines showed a profound variation in the expression of both c-Kit and SCF not being influenced by X-irradiation nor culturing conditions. Comparing 2D with 3D conditions, it was shown that cells grown in 3D were more resistant to X-irradiation as previously reported by others. Knock-down of SCF was generally found to result in no radiosensitization neither under 2D nor 3D conditions.

For both cell lines an increase in cell motility was demonstrated when grown in 3D. This can be the result from an EMT-like change as indicated by the enhanced expression of vimentin and N-cadherin and reduction of E-cadherin. This effect was considered to result from a more mesenchymal phenotype under 3D cultural conditions leading to an increase of cell motility. This transition is independent from SCF/c-Kit pathway influencing cell motility. In contrast, X-irradiation did not modulate cell motility or EMT-associated genes.

My data show that generally the knockdown of SCF/c-Kit pathway does not result in a radiosensitization. Therefore SCF does not appear to be an effective biomarker for radiosensitization in NSCLC. More NSCLC should be characterized to proof my assumptions to be true. In the tested cell lines X-irradiation did not modulate cell motility, which could be harmed by inhibition of SCF/c-Kit pathway. Therefore this inhibition combined with radiotherapy may provide a potential tool in metastatic NSCLC.

Summarising my findings indicate that SCF/c-Kit pathway is very important for metastasis of NSCLC, but not for radioresistance.

8. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2005) *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Herausgegeben von L. Nover und P. von Koskull-Döring. Wiley-VCH.

Alexander, S. und Friedl, P. (2012) „Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure“, *Trends in molecular medicine*, 18(1), S. 13–26. doi: 10.1016/j.molmed.2011.11.003.

Antonescu, C. R. (2011) „The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers“, *The Journal of Pathology*, 223(2), S. 252–262. doi: 10.1002/path.2798.

Ashman, L. K. (1999) „The biology of stem cell factor and its receptor C-kit“, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(10), S. 1037–1051. doi: 10.1016/S1357-2725(99)00076-X.

Ashman, L. K. und Griffith, R. (2013) „Therapeutic targeting of c-KIT in cancer“, *Expert opinion on investigational drugs*, 22(1), S. 103–115. doi: 10.1517/13543784.2013.740010.

Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R. und Fox, J. W. (1993) „Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components.“, *Kidney international*, 43(1), S. 7–12.

Barone, F., Belli, M., Pazzaglia, S., Sapor, O. und Tabocchini, M. A. (1989) „Radiation damage and chromatin structure.“, *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 25(1), S. 59–67.

Barros, E. J., Santos, O. F., Matsumoto, K., Nakamura, T. und Nigam, S. K. (1995) „Differential tubulogenic and branching morphogenetic activities of growth factors: implications for epithelial tissue development.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 92(10), S. 4412–6.

Baumann, M., Krause, M., Zips, D., Petersen, C., Dittmann, K., Dörr, W. und Rodemann, H.-P. (2004) „Molecular targeting in radiotherapy of lung cancer“, *Lung Cancer*. Elsevier, 45, S. S187–S197. doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2004.07.975.

Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F. M. und Birchmeier, W. (1989) „Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of

uvomorulin-mediated cell-cell adhesion.“, *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 108(6), S. 2435–47.

Bellone, G., Ferrero, D., Carbone, A., De Quadros, M. R., Gramigni, C., Prati, A., Davidson, W., Mioli, P., Dughera, L., Emanuelli, G. und Rodeck, U. (2004) „Inhibition of cell survival and invasive potential of colorectal carcinoma cells by the tyrosine kinase inhibitor STI571.“, *Cancer biology & therapy*, 3(4), S. 385–92.

Bellone, G., Silvestri, S., Artusio, E., Tibaudi, D., Turletti, A., Geuna, M., Giachino, C., Valente, G., Emanuelli, G. und Rodeck, U. (1997) „Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF- β 1“, *Journal of Cellular Physiology*, 172(1), S. 1–11. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199707)172:1<1::AID-JCP1>3.0.CO;2-S.

Berrier, A. L. und Yamada, K. M. (2007) „Cell–matrix adhesion“, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Blackwell, 213(3), S. 565–573. doi: 10.1002/jcp.21237.

Le Beyec, J., Xu, R., Lee, S.-Y., Nelson, C. M., Rizki, A., Alcaraz, J. und Bissell, M. J. (2007) „Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells.“, *Experimental cell research*. NIH Public Access, 313(14), S. 3066–75. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.04.022.

Biard, D. S., Martin, M., Rhun, Y. L., Duthu, A., Lefaix, J. L., May, E. und May, P. (1994) „Concomitant p53 gene mutation and increased radiosensitivity in rat lung embryo epithelial cells during neoplastic development.“, *Cancer research*. American Association for Cancer Research, 54(13), S. 3361–4.

Bissell, M. J., Hall, H. G. und Parry, G. (1982) „How does the extracellular matrix direct gene expression?“, *Journal of Theoretical Biology*. Academic Press, 99(1), S. 31–68. doi: 10.1016/0022-5193(82)90388-5.

Bissell, M. J., Weaver, V. M., Lelièvre, S. A., Wang, F., Petersen, O. W. und Schmeichel, K. L. (1999) „Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast.“, *Cancer research*, 59(7 Suppl), S. 1757–1763s; discussion 1763s–1764s.

Blume-Jensen, P., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Zsebo, K. M., Westermark, B. und Heldin, C. H. (1991) „Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis.“, *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 10(13), S. 4121–8.

Blume-Jensen, P., Janknecht, R. und Hunter, T. (1998) „The kit receptor promotes cell

survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136.“, *Current biology: CB*, 8(13), S. 779–82.

Booell, V., Alamgeer, M., Watkins, D. N. und Ganju, V. (2015) „The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer“, *Cancers*, 7(3), S. 1815–1846. doi: 10.3390/cancers7030864.

Bowers, S. L. K., Banerjee, I. und Baudino, T. A. (2010) „The extracellular matrix: at the center of it all.“, *Journal of molecular and cellular cardiology*. NIH Public Access, 48(3), S. 474–82. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.024.

Boyer, B., Roche, S., Denoyelle, M. und Paul Thiery, J. (1997) „Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering“, *The EMBO Journal*, 16(19), S. 5904–5913. doi: 10.1093/emboj/16.19.5904.

Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A. und Kirchner, T. (2005) „Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem Cells and β -Catenin“, *Cells Tissues Organs*, 179(1–2), S. 56–65. doi: 10.1159/000084509.

Brammer, E. und Dikomey, I. (2000) „Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line“, *International Journal of Radiation Biology*. Taylor & Francis, 76(6), S. 773–781. doi: 10.1080/09553000050028922.

Bromann, P. A., Korkaya, H. und Courtneidge, S. A. (2004) „The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases“, *Oncogene*, 23(48), S. 7957–7968. doi: 10.1038/sj.onc.1208079.

Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J. und Lydon, N. B. (2000) „Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors“, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 295(1), S. 139–145.

Burdsal, C. A., Damsky, C. H. und Pedersen, R. A. (1993) „The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak“, *Development*, 118(3).

Carlino, M. S., Todd, J. R. und Rizos, H. (2014) „Resistance to c-Kit inhibitors in melanoma: insights for future therapies“, *Oncoscience*, 1(6), S. 423–426. doi: 10.18632/oncoscience.51.

Chen, W. C. und Obrink, B. (1991) „Cell-cell contacts mediated by E-cadherin (uvomorulin) restrict invasive behavior of L-cells.“, *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 114(2), S. 319–27.

Coffin, J. M. und Fan, H. (2016) „The Discovery of Reverse Transcriptase“, *Annual Review of Virology*, 3(1), S. 29–51. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-035556.

Cohen, A., Tiplica, T. und Kobi, A. (2016) „OWave control chart for monitoring the process mean“, *Control Engineering Practice*, 54(4839), S. 223–230. doi: 10.1016/j.conengprac.2016.06.002.

Cordes, N. (2006) „Integrin-mediated cell-matrix interactions for prosurvival and antiapoptotic signaling after genotoxic injury.“, *Cancer letters*. Elsevier, 242(1), S. 11–9. doi: 10.1016/j.canlet.2005.12.004.

Cordes, N. und Van Beuningen, D. (2003) „Cell adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin modulates radiation-dependent G2 phase arrest involving integrin-linked kinase (ILK) and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) in vitro.“, *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 88(9), S. 1470–9. doi: 10.1038/sj.bjc.6600912.

Cordes, N., Blaese, M. A., Meineke, V. und Van Beuningen, D. (2002) „Ionizing radiation induces up-regulation of functional β 1-integrin in human lung tumour cell lines in vitro“, *International Journal of Radiation Biology*. Taylor & Francis, 78(5), S. 347–357. doi: 10.1080/09553000110117340.

Cordes, N., Hansmeier, B., Beinke, C., Meineke, V. und Van Beuningen, D. (2003) „Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines“, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 89(11), S. 2122–2132. doi: 10.1038/sj.bjc.6601429.

Cordes, N. und Meineke, V. (2003) „Cell Adhesion-Mediated Radioresistance (CAM-RR) Extracellular Matrix-Dependent Improvement of Cell Survival in Human Tumor and Normal Cells in Vitro“, *Strahlentherapie und Onkologie*. Urban & Vogel, 179(5), S. 337–344. doi: 10.1007/s00066-003-1074-4.

Cordes, N., Seidler, J., Durzok, R., Geinitz, H. und Brakebusch, C. (2006) „B1-Integrin-Mediated Signaling Essentially Contributes To Cell Survival After Radiation-Induced Genotoxic Injury“, *Oncogene*. Nature Publishing Group, 25(9), S. 1378–1390. doi: 10.1038/sj.onc.1209164.

Corso, C. D., Rutter, C. E., Park, H. S., Lester-Coll, N. H., Kim, A. W., Wilson, L. D.,

- Husain, Z. A., Lilenbaum, R. C., Yu, J. B. und Decker, R. H. (2015) „Role of Chemoradiotherapy in Elderly Patients With Limited-Stage Small-Cell Lung Cancer“, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(36), S. 4240–4246. doi: 10.1200/JCO.2015.62.4270.
- Cowell, I. G., Sunter, N. J., Singh, P. B., Austin, C. A., Durkacz, B. W. und Tilby, M. J. (2007) „ γ H2AX Foci Form Preferentially in Euchromatin after Ionising-Radiation“, *PLoS ONE*. Herausgegeben von B. Sullivan. Public Library of Science, 2(10), S. e1057. doi: 10.1371/journal.pone.0001057.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R. und Yamada, K. M. (2001) „Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension“, *Science*, 294(5547), S. 1708–1712. doi: 10.1126/science.1064829.
- Cukierman, E., Pankov, R. und Yamada, K. M. (2002) „Cell interactions with three-dimensional matrices“, *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, 14(5), S. 633–640. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00364-2.
- D'Auriol, L., Mattei, M.-G., Andre, C. und Galibert, F. (1988) „Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4“, *Human Genetics*. Springer-Verlag, 78(4), S. 374–376. doi: 10.1007/BF00291740.
- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A. und Dalton, W. S. (1999) „Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines.“, *Blood*. NIH Public Access, 93(5), S. 1658–67.
- Day, R. M., Cioce, V., Breckenridge, D., Castagnino, P. und Bottaro, D. P. (1999) „Differential signaling by alternative HGF isoforms through c-Met: activation of both MAP kinase and PI 3-kinase pathways is insufficient for mitogenesis“, *Oncogene*. Nature Publishing Group, 18(22), S. 3399–3406. doi: 10.1038/sj.onc.1202683.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. und Barton, M. (2005) „The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines“, *Cancer*, 104(6), S. 1129–1137. doi: 10.1002/cncr.21324.
- Derycke, L. D. M. und Bracke, M. E. (2004) „N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling.“, *The International journal of developmental biology*. UPV/EHU Press, 48(5–6), S. 463–76. doi: 10.1387/ijdb.041793ld.
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R. und Kaina, B. (1998)

„Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double- strand breaks studied in nine mammalian cell lines“, *International Journal of Radiation Biology*, 73(3), S. 269–278. doi: 10.1080/095530098142365.

Donnenberg, A. D., Zimmerlin, L., Landreneau, R. J., Luketich, J. D. und Donnenberg, V. S. (2012) „KIT (CD117) expression in a subset of non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients“, *PloS one*, 7(12), S. e52885. doi: 10.1371/journal.pone.0052885.

Eberle, F., Leinberger, F. H., Saulich, M. F., Seeger, W., Engenhart-Cabillic, R., Hänze, J., Hattar, K., Dikomey, E. und Subtil, F. S. B. (2017) „In cancer cell lines inhibition of SCF/c-Kit pathway leads to radiosensitization only when SCF is strongly over-expressed“, *Clinical and Translational Radiation Oncology*, 2, S. 69–75. doi: 10.1016/j.ctro.2017.02.001.

Eberle, F., Saulich, M. F., Leinberger, F. H., Seeger, W., Engenhart-Cabillic, R., Dikomey, E., Hänze, J., Hattar, K. und Subtil, F. S. B. (2016) „Cancer cell motility is affected through 3D cell culturing and SCF/c-Kit pathway but not by X-irradiation“, *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 119(3), S. 537–543. doi: 10.1016/j.radonc.2016.04.036.

Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T. und Martin, P. (2000) „Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin.“, *Journal of cell science*, 113 (Pt 1, S. 2455–62.

Edelman, G. M., Gallin, W. J., Delouvé, A., Cunningham, B. A. und Thiery, J. P. (1983) „Early epochal maps of two different cell adhesion molecules.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 80(14), S. 4384–8.

Eke, I., Hehlhans, S., Zong, Y. und Cordes, N. (2015) „Comprehensive analysis of signal transduction in three-dimensional ECM-based tumor cell cultures“, *Journal of Biological Methods*. NIH Public Access, 2(4), S. 31. doi: 10.14440/jbm.2015.96.

Eke, I., Leonhardt, F., Storch, K., Hehlhans, S. und Cordes, N. (2009) „The small molecule inhibitor QLT0267 Radiosensitizes squamous cell carcinoma cells of the head and neck“, *PloS one*, 4(7), S. e6434. doi: 10.1371/journal.pone.0006434.

Eke, I., Sandfort, V., Mischkus, A., Baumann, M. und Cordes, N. (2006) „Antiproliferative effects of EGFR tyrosine kinase inhibition and radiation-induced genotoxic injury are attenuated by adhesion to fibronectin“, *Radiotherapy and Oncology*, 80(2), S. 178–184. doi: 10.1016/j.radonc.2006.07.028.

Eke, I., Storch, K., Kästner, I., Vehlow, A., Faethe, C., Mueller-Klieser, W., Taucher-Scholz, G., Temme, A., Schackert, G. und Cordes, N. (2012) „Three-dimensional Invasion of Human Glioblastoma Cells Remains Unchanged by X-ray and Carbon Ion Irradiation In Vitro“, *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 84(4), S. e515–e523. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.06.012.

El-Awady, R. A., Dikomey, E. und Dahm-Daphi, J. (2003) „Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks.“, *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 89(3), S. 593–601. doi: 10.1038/sj.bjc.6601133.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T. (2001) „Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells“, *Nature*, 411(6836), S. 494–498. doi: 10.1038/35078107.

Erickson, A. C. und Couchman, J. R. (2000) „Still More Complexity in Mammalian Basement Membranes“, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 48(10), S. 1291–1306. doi: 10.1177/002215540004801001.

Estrugo, D., Fischer, A., Hess, F., Scherthan, H., Belka, C. und Cordes, N. (2007) „Ligand bound $\beta 1$ integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells“, *PLoS ONE*. Public Library of Science, 2(3), S. e269. doi: 10.1371/journal.pone.0000269.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. und Bray, F. (2015) „Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012“, *International Journal of Cancer*, 136(5), S. E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.

Van der Flier, A. und Sonnenberg, A. (2001) „Function and interactions of integrins.“, *Cell and tissue research*, 305(3), S. 285–98.

Fowler, J. F. (1989) „The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy“, *The British Journal of Radiology*. The British Institute of Radiology , 62(740), S. 679–694. doi: 10.1259/0007-1285-62-740-679.

Franke, W. W., Hergt, M. und Grund, C. (1987) „Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules.“, *Cell*, 49(1), S. 131–41.

Fujita, M., Otsuka, Y., Yamada, S., Iwakawa, M. und Imai, T. (2011) „X-ray irradiation

and Rho-kinase inhibitor additively induce invasiveness of the cells of the pancreatic cancer line, MIAPaCa-2, which exhibits mesenchymal and amoeboid motility“, *Cancer science*, 102(4), S. 792–798. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01852.x.

Gao, C., Li, S., Zhao, T., Chen, J., Ren, H., Zhang, H., Wang, X., Lang, M., Liu, J., Gao, S., Zhao, X., Sheng, J., Yuan, Z. und Hao, J. (2015) „SCF, regulated by HIF-1alpha, promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell progression“, *PloS one*, 10(3), S. e0121338. doi: 10.1371/journal.pone.0121338.

Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Brabletz, T. und Ben-Ze'ev, A. (2005) „L1, a novel target of β -catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers“, *The Journal of Cell Biology*, 168(4).

Ghajar, C. M. und Bissell, M. J. (2008) „Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging.“, *Histochemistry and cell biology*. NIH Public Access, 130(6), S. 1105–18. doi: 10.1007/s00418-008-0537-1.

Giancotti, F. G. und Ruoslahti, E. (1999) „Integrin signaling.“, *Science (New York, N.Y.)*, 285(5430), S. 1028–32.

Gilbert, C. W., Hendry, J. H. und Major, D. (1980) „The approximation in the formulation for survival $S = \exp(-\alpha D + \beta D^2)$.“, *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 37(4), S. 469–71.

Goeckenjan, G., Sitter, H., Thomas, M., Branscheid, D., Flentje, M., Griesinger, F., Niederle, N., Stuschke, M., Blum, T., Deppermann, K.-M., Ficker, J. H., Freitag, L., Lubbe, A. S., Reinhold, T., Spath-Schwalbe, E., Ukena, D., Wickert, M., Wolf, M., Andreas, S., Auberger, T., Baum, R. P., Baysal, B., Beuth, J., Bickeboller, H., Bocking, A., Bohle, R. M., Bruske, I., Burghuber, O., Dickgreber, N., Diederich, S., Dienemann, H., Eberhardt, W., Eggeling, S., Fink, T., Fischer, B., Franke, M., Friedel, G., Gauler, T., Gutz, S., Hautmann, H., Hellmann, A., Hellwig, D., Herth, F., Heussel, C. P., Hilbe, W., Hoffmeyer, F., Horneber, M., Huber, R. M., Hubner, J., Kauczor, H.-U., Kirchbacher, K., Kirsten, D., Kraus, T., Lang, S. M., Martens, U., Mohn-Staudner, A., Muller, K.-M., Muller-Nordhorn, J., Nowak, D., Ochmann, U., Passlick, B., Petersen, I., Pirker, R., Pokrajac, B., Reck, M., Riha, S., Rube, C., Schmittel, A., Schonfeld, N., Schutte, W., Serke, M., Stamatis, G., Steingraber, M., Steins, M., Stoelben, E., Swoboda, L., Teschler, H., Tessen, H. W., Weber, M., Werner, A., Wichmann, H.-E., Irlinger Wimmer, E., Witt, C. und Worth, H. (2011) „Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer. Interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society--abridged version“, *Pneumologie (Stuttgart*,

Germany), 65(8), S. e51-75. doi: 10.1055/s-0030-1256562.

Goodarzi, A. A., Noon, A. T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M. und Jeggo, P. A. (2008) „ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin.“, *Molecular cell*. Elsevier, 31(2), S. 167–77. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.017.

Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N. und Sawyers, C. L. (2001) „Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification“, *Science*, 293(5531), S. 876–880. doi: 10.1126/science.1062538.

Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Hornsey, S. und Scott, O. C. A. (1953) „The Concentration of Oxygen Dissolved in Tissues at the Time of Irradiation as a Factor in Radiotherapy“, *The British Journal of Radiology*. The British Institute of Radiology , 26(312), S. 638–648. doi: 10.1259/0007-1285-26-312-638.

Grewal, S. I. S. und Jia, S. (2007) „Heterochromatin revisited“, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 8(1), S. 35–46. doi: 10.1038/nrg2008.

Grünert, S., Jechlinger, M. und Beug, H. (2003) „Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(8), S. 657–665. doi: 10.1038/nrm1175.

Guckenberger, M., Andratschke, N., Alheit, H., Holy, R., Moustakis, C., Nestle, U. und Sauer, O. (2014) „Definition of stereotactic body radiotherapy: principles and practice for the treatment of stage I non-small cell lung cancer“, *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]*, 190(1), S. 26–33. doi: 10.1007/s00066-013-0450-y.

Gumbiner, B. M., Assoian, R. K., Tsukita, S., Takeichi, M., Franke, W. W., Grübel, G., Legrand, J.-F., Als-Neilsen, J., Colman, D. R. und Hendrickson, W. A. (1996) „Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.“, *Cell*. Elsevier, 84(3), S. 345–57. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81279-9.

Guo, M., Ehrlicher, A. J., Mahammad, S., Fabich, H., Jensen, M. H., Moore, J. R., Fredberg, J. J., Goldman, R. D. und Weitz, D. A. (2013) „The role of vimentin intermediate filaments in cortical and cytoplasmic mechanics.“, *Biophysical journal*. The Biophysical Society, 105(7), S. 1562–8. doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.037.

Guo, W.-F., Lin, R.-X., Huang, J., Zhou, Z., Yang, J., Guo, G.-Z. und Wang, S.-Q. (2005) „Identification of differentially expressed genes contributing to radioresistance in

lung cancer cells using microarray analysis.“, *Radiation research*, 164(1), S. 27–35.

Hagios, C., Lochter, A. und Bissell, M. J. (1998) „Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function?“, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. The Royal Society, 353(1370), S. 857–70. doi: 10.1098/rstb.1998.0250.

Hall, E. J. und Giaccia, A. J. (2011) *Radiobiology for the radiologist*.

Hay, E. D. (1995) „An overview of epithelio-mesenchymal transformation.“, *Acta anatomica*, 154(1), S. 8–20.

Hazan, R. B., Kang, L., Whooley, B. P. und Borgen, P. I. (1997) „N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma.“, *Cell adhesion and communication*, 4(6), S. 399–411.

Hehlhans, S., Eke, I., Storch, K., Haase, M., Baretton, G. B. und Cordes, N. (2009) „Caveolin-1 mediated radioresistance of 3D grown pancreatic cancer cells“, *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), S. 362–370. doi: 10.1016/j.radonc.2009.07.004.

Heinrich, M. C., Griffith, D. J., Druker, B. J., Wait, C. L., Ott, K. A. und Zigler, A. J. (2000) „Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor.“, *Blood*, 96(3), S. 925–32.

Heissig, B., Werb, Z., Rafii, S. und Hattori, K. (2003) „Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis“, *Thrombosis and Haemostasis*, 90(4), S. 570–6. doi: 10.1160/TH03-03-0188.

Heldin, C.-H. und Lennartsson, J. (2013) „Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors“, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), S. a009100. doi: 10.1101/cshperspect.a009100.

Henrion, D., Terzi, F., Matrougui, K., Duriez, M., Boulanger, C. M., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Briand, P., Friedlander, G., Poitevin, P. und Lévy, B. I. (1997) „Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin.“, *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 100(11), S. 2909–14. doi: 10.1172/JCI119840.

Herrmann, T., Baumann, M. und Dörr, W. (2006) *Klinische Strahlenbiologie: Kurz und bündig*. 4. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. und Watson, R. (1993) „Kinetic PCR analysis:

Real-time monitoring of DNA amplification reactions“, *Nature Biotechnology*, 11(9), S. 1026–1030. doi: 10.1038/nbt0993-1026.

Holdhoff, M., Kreuzer, K.-A., Appelt, C., Scholz, R., Na, I.-K., Hildebrandt, B., Riess, H., Jordan, A., Schmidt, C. A., van Etten, R. A., Dorken, B. und Le Coutre, P. (2005) „Imatinib mesylate radiosensitizes human glioblastoma cells through inhibition of platelet-derived growth factor receptor“, *Blood cells, molecules & diseases*, 34(2), S. 181–185. doi: 10.1016/j.bcmd.2004.11.006.

Huizinga, J. D., Thuneberg, L., Kluppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H. B. und Bernstein, A. (1995) „W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity“, *Nature*, 373(6512), S. 347–349. doi: 10.1038/373347a0.

Hynes, R. O. (2002) „Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines“, *Cell*. Elsevier, 110(6), S. 673–87. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6.

Iqbal, N. und Iqbal, N. (2014) „Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer“, *Chemotherapy research and practice*. Hindawi Publishing Corporation, 2014, S. 357027. doi: 10.1155/2014/357027.

Islam, S., Carey, T. E., Wolf, G. T., Wheelock, M. J. und Johnson, K. R. (1996) „Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion.“, *The Journal of Cell Biology*, 135(6).

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. und Minick, C. R. (1973) „Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria“, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 52(11), S. 2745–2756. doi: 10.1172/JCI107470.

Janssen-Heijnen, M. L. G. und Coebergh, J. W. W. (2003) „The changing epidemiology of lung cancer in Europe“, *Lung Cancer*, 41(3), S. 245–258. doi: 10.1016/S0169-5002(03)00230-7.

Jin, K., Mao, X. O., Sun, Y., Xie, L. und Greenberg, D. A. (2002) „Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo“, *The Journal of clinical investigation*, 110(3), S. 311–319. doi: 10.1172/JCI15251.

Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Tremel, K., Weg-Remers, S., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke,

M., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A. und Wolf, U. (2015) „Krebs in Deutschland 2011/2012“, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Robert Koch-Institut, 10. Ausgab, S. 156. doi: 10.17886/rkipubl-2015-004.

Kalluri, R. und Neilson, E. G. (2003) „Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.“, *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 112(12), S. 1776–84. doi: 10.1172/JCI20530.

Kalluri, R. und Weinberg, R. A. (2009) „The basics of epithelial-mesenchymal transition“, *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), S. 1420–1428. doi: 10.1172/JCI39104.1420.

Kamlah, F., Hänze, J., Arenz, A., Seay, U., Hasan, D., Juricko, J., Bischoff, B., Gottschald, O. R., Fournier, C., Taucher-Scholz, G., Scholz, M., Seeger, W., Engenhart-Cabillic, R. und Rose, F. (2011) „Comparison of the effects of carbon ion and photon irradiation on the angiogenic response in human lung adenocarcinoma cells“, *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 80(5), S. 1541–1549. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.03.033.

Kanaar, R., Hoeijmakers, J. H. J. und van Gent, D. C. (1998) „Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair“, *Trends in Cell Biology*, 8(12), S. 483–489. doi: 10.1016/S0962-8924(98)01383-X.

Karagiannis, T. C. und El-Osta, A. (2007) „Chromatin modifications and DNA double-strand breaks: the current state of play“, *Leukemia*. Nature Publishing Group, 21(2), S. 195–200. doi: 10.1038/sj.leu.2404478.

Karran, P. (2000) „DNA double strand break repair in mammalian cells.“, *Current opinion in genetics & development*, 10(2), S. 144–50.

Kasten-Pisula, U., Tastan, H. und Dikomey, E. (2005) „Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity“, *International Journal of Radiation Biology*. Taylor & Francis, 81(6), S. 409–419. doi: 10.1080/09553000500140498.

Kenny, P. A. (2007) „Three-dimensional extracellular matrix culture models of EGFR signalling and drug response“, *Biochemical Society Transactions*, 35(4).

Khanna, P., Blais, N., Gaudreau, P.-O. und Corrales-Rodriguez, L. (2016) „Immunotherapy Comes of Age in Lung Cancer“, *Clinical lung cancer*. Elsevier Inc., S. 1–10. doi: 10.1016/j.clcc.2016.06.006.

- Kim, J.-A., Kruhlak, M., Dotiwala, F., Nussenzweig, A. und Haber, J. E. (2007) „Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals.“, *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 178(2), S. 209–18. doi: 10.1083/jcb.200612031.
- Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. N., Sheppard, D. und Chapman, H. A. (2006) „Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(35), S. 13180–5. doi: 10.1073/pnas.0605669103.
- Kim, S.-H., Turnbull, J. und Guimond, S. (2011) „Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor.“, *The Journal of endocrinology*. BioScientifica, 209(2), S. 139–51. doi: 10.1530/JOE-10-0377.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. und Khorana, H. G. (1971) „Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases“, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 56(2), S. 341–361. doi: 10.1016/0022-2836(71)90469-4.
- Krieger, H. und Petzold, W. (1992) „Wechselwirkung ionisierender Photonenstrahlung mit Materie“, in *Strahlenphysik, Dosimetrie und Strahlenschutz*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, S. 105–158. doi: 10.1007/978-3-322-94129-9_4.
- Krystal, G. W., Honsawek, S., Kiewlich, D., Liang, C., Vasile, S., Sun, L., McMahon, G. und Lipson, K. E. (2001) „Indolinone tyrosine kinase inhibitors block Kit activation and growth of small cell lung cancer cells“, *Cancer research*, 61(9), S. 3660–3668.
- Kuonen, F., Laurent, J., Secondini, C., Lorusso, G., Stehle, J.-C., Rausch, T., Faes-Van't Hull, E., Bieler, G., Alghisi, G.-C., Schwendener, R., Andrejevic-Blant, S., Mirimanoff, R.-O. und Rüegg, C. (2012) „Inhibition of the Kit ligand/c-Kit axis attenuates metastasis in a mouse model mimicking local breast cancer relapse after radiotherapy“, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(16), S. 4365–4374. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3028.
- Kuonen, F., Secondini, C. und Rüegg, C. (2012) „Molecular pathways: emerging pathways mediating growth, invasion, and metastasis of tumors progressing in an irradiated microenvironment“, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(19), S. 5196–5202. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1758.

Larsen, M., Artym, V. V., Green, J. A. und Yamada, K. M. (2006) „The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling“, *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, 18(5), S. 463–471. doi: 10.1016/J.CEB.2006.08.009.

Lee, J.-U., Hosotani, R., Wada, M., Doi, R., Kosiba, T., Fujimoto, K., Miyamoto, Y., Tsuji, S., Nakajima, S., Nishimura, Y. und Imamura, M. (1999) „Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells“, *European Journal of Cancer*. Elsevier, 35(9), S. 1374–1380. doi: 10.1016/S0959-8049(99)00134-3.

Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R. und Thompson, E. W. (2006) „The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development and disease.“, *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 172(7), S. 973–81. doi: 10.1083/jcb.200601018.

Leigh, B. R., Hancock, S. L., Knox, S. J. und Webb, S. (1994) „Stem cell factor enhances the survival of irradiated human bone marrow maintained in SCID mice“, *Stem Cells*. John Wiley & Sons, Ltd., 12(4), S. 430–435. doi: 10.1002/stem.5530120411.

Lelièvre, S. A. (2009) „Contributions of extracellular matrix signaling and tissue architecture to nuclear mechanisms and spatial organization of gene expression control.“, *Biochimica et biophysica acta*. NIH Public Access, 1790(9), S. 925–35. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.013.

Lelièvre, S. A., Weaver, V. M., Nickerson, J. A., Larabell, C. A., Bhaumik, A., Petersen, O. W. und Bissell, M. J. (1998) „Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 95(25), S. 14711–6.

Lennartsson, J. und Rönnstrand, L. (2012) „Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications“, *Physiological reviews*, 92(4), S. 1619–1649. doi: 10.1152/physrev.00046.2011.

Lindsey, J. Y., Ganguly, K., Brass, D. M., Li, Z., Potts, E. N., Degan, S., Chen, H., Brockway, B., Abraham, S. N., Berndt, A., Stripp, B. R., Foster, W. M., Leikauf, G. D., Schulz, H. und Hollingsworth, J. W. (2011) „c-Kit Is Essential for Alveolar Maintenance and Protection from Emphysema-like Disease in Mice“, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(12), S. 1644–1652. doi:

10.1164/rccm.201007-1157OC.

Liu, H., Chen, X., Focia, P. J. und He, X. (2007) „Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases“, *The EMBO journal*, 26(3), S. 891–901. doi: 10.1038/sj.emboj.7601545.

Lodish, H. F. (2000) *Molecular cell biology*. 4th ed. W.H. Freeman.

Longo, M. C., Berninger, M. S. und Hartley, J. L. (1990) „Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions.“, *Gene*, 93(1), S. 125–8.

Maddens, S., Charruyer, A., Plo, I., Dubreuil, P., Berger, S., Salles, B., Laurent, G. und Jaffr  zou, J.-P. (2002) „Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect“, *Blood*, 100(4), S. 1294–1301.

Mainetti, L. E., Zhe, X., Diedrich, J., Saliganan, A. D., Cho, W. J., Cher, M. L., Heath, E., Fridman, R., Kim, H.-R. C. und Bonfil, R. D. (2015) „Bone-induced c-kit expression in prostate cancer: a driver of intraosseous tumor growth“, *International journal of cancer*, 136(1), S. 11–20. doi: 10.1002/ijc.28948.

Marech, I., Gadaleta, C. D. und Ranieri, G. (2014) „Possible prognostic and therapeutic significance of c-Kit expression, mast cell count and microvessel density in renal cell carcinoma“, *International journal of molecular sciences*, 15(7), S. 13060–13076. doi: 10.3390/ijms150713060.

Martin, F. H., Suggs, S. V., Langley, K. E., Lu, H. S., Ting, J., Okino, K. H., Morris, C. F. F., McNiece, I. K., Jacobsen, F. W., Mendiaz, E. A., Mendlaz, E. A., Birkett, N. C., Smith, K. A., Johnson, M. J., Parker, V. P., Flores, J. C., Patel, A. C., Fisher, E. F., Erjavec, H. O., Herrera, C. J., Wypych, J., Sachdev, R. K., Pope, J. A., Leslie, I., Wen, D., Lin, C.-H., Cupples, R. L. und Zsebo, K. M. (1990) „Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs.“, *Cell. Elsevier*, 63(1), S. 203–211. doi: 10.1016/0092-8674(90)90301-T.

Meineke, V., Müller, K., Ridi, R., Cordes, N., K  hn, F.-M., Mayerhofer, A., Ring, J. und Van Beuningen, D. (2004) „Development and Evaluation of a Skin Organ Model for the Analysis of Radiation Effects“, *Strahlentherapie und Onkologie*. Urban & Vogel, 180(2), S. 102–108. doi: 10.1007/s00066-004-1134-4.

Morgan, S. J., Smith, A. D. und Parker, P. J. (1990) „Purification and characterization of bovine brain type I phosphatidylinositol kinase.“, *European journal of biochemistry*,

191(3), S. 761–7.

Mortimer, C. E. und Müller, U. (2007) *Chemie: das Basiswissen der Chemie*.

Müller-Tidow, C., Krug, U., Brunnberg, U. und Berdel, W. E. (2007) „Tyrosinkinasen als Ziele neuer onkologischer Therapien“, *Deutsches Ärzteblatt*.

Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R.-H., Fingar, D. C. und Blenis, J. (2002) „Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products“, *Nature Cell Biology*, 4(8), S. 556–64. doi: 10.1038/ncb822.

Nelson, C. M. und Bissell, M. J. (2006) „Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer.“, *Annual review of cell and developmental biology*. NIH Public Access, 22, S. 287–309. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315.

Nieminen, M., Henttinen, T., Merinen, M., Marttila–Ichihara, F., Eriksson, J. E. und Jalkanen, S. (2006) „Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration“, *Nature Cell Biology*, 8(2), S. 156–162. doi: 10.1038/ncb1355.

Oertel, S., Krempien, R., Lindel, K., Zabel, A., Milker-Zabel, S., Bischof, M., Lipson, K. E., Peschke, P., Debus, J., Abdollahi, A. und Huber, P. E. (2006) „Human glioblastoma and carcinoma xenograft tumors treated by combined radiation and imatinib (Gleevec)“, *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]*, 182(7), S. 400–407. doi: 10.1007/s00066-006-1445-8.

Ogata, T., Teshima, T., Inaoka, M., Minami, K., Tsuchiya, T., Isono, M., Furusawa, Y. und Matsuura, N. (2011) „Carbon Ion Irradiation Suppresses Metastatic Potential of Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells through the Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signaling Pathway“, *Journal of Radiation Research*, 52(3), S. 374–379. doi: 10.1269/jrr.10102.

Ogata, T., Teshima, T., Kagawa, K., Hishikawa, Y., Takahashi, Y., Kawaguchi, A., Suzumoto, Y., Nojima, K., Furusawa, Y. und Matsuura, N. (2005) „Particle Irradiation Suppresses Metastatic Potential of Cancer Cells“, *Cancer Research*, 65(1).

Ogawa, K., Murayama, S. und Mori, M. (2007) „Predicting the tumor response to radiotherapy using microarray analysis (Review)“, *Oncology Reports*. Spandidos Publications, 18(5), S. 1243–1248. doi: 10.3892/or.18.5.1243.

Olive, P. L. (1998) „The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation.“, *Radiation research*, 150(5 Suppl), S. S42-51.

- Peacock, J. H., de Almodóvar, M. R., McMillan, T. J. und Steel, G. G. (1992) „The nature of the initial slope of radiation cell survival curves.“, *BJR supplement*, 24, S. 57–60.
- Pelosi, G., Barisella, M., Pasini, F., Leon, M. E., Veronesi, G., Spaggiari, L., Fraggetta, F., Iannucci, A., Masullo, M., Sonzogni, A., Maffini, F. und Viale, G. (2004) „CD117 immunoreactivity in stage I adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: relevance to prognosis in a subset of adenocarcinoma patients.“, *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* Nature Publishing Group, 17(6), S. 711–21. doi: 10.1038/modpathol.3800110.
- Perez-Losada, J., Sanchez-Martin, M., Perez-Caro, M., Perez-Mancera, P. A., Sanchez-Garcia, I., Pérez-Losada, J., Sánchez-Martín, M., Pérez-Caro, M., Pérez-Mancera, P. A. und Sánchez-García, I. (2003) „The radioresistance biological function of the SCF/kit signaling pathway is mediated by the zinc-finger transcription factor Slug“, *Oncogene*, 22(27), S. 4205–4211. doi: 10.1038/sj.onc.1206467.
- Perumal, D., Pillai, S., Nguyen, J., Schaal, C., Coppola, D. und Chellappan, S. P. (2014) „Nicotinic acetylcholine receptors induce c-Kit ligand/Stem Cell Factor and promote stemness in an ARRB1/ beta-arrestin-1 dependent manner in NSCLC“, *Oncotarget*, 5(21), S. 10486–10502. doi: 10.18632/oncotarget.2395.
- Phelps, R. M., Johnson, B. E., Ihde, D. C., Gazdar, A. F., Carbone, D. P., McClintock, P. R., Linnoila, R. I., Matthews, M. J., Bunn, P. A., Carney, D., Minna, J. D. und Mulshine, J. L. (1996) „NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base.“, *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, 24, S. 32–91.
- Pietsch, T., Nicotra, M. R., Fraioli, R., Wolf, H. K., Mottolese, M. und Natali, P. G. (1998) „Expression of the c-Kit receptor and its ligand SCF in non-small-cell lung carcinomas“, *International journal of cancer*, 75(2), S. 171–175.
- Pittoni, P., Piconese, S., Tripodo, C. und Colombo, M. P. (2011) „Tumor-intrinsic and -extrinsic roles of c-Kit: mast cells as the primary off-target of tyrosine kinase inhibitors“, *Oncogene*. Nature Publishing Group, 30(7), S. 757–769. doi: 10.1038/onc.2010.494.
- Polo, A. S., Itokazu, M. K. und Murakami Iha, N. Y. (2004) „Metal complex sensitizers in dye-sensitized solar cells“, *Coordination Chemistry Reviews*, 248(13–14), S. 1343–1361. doi: 10.1016/j.ccr.2004.04.013.
- Potempa, S. und Ridley, A. J. (1998) „Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter

factor-induced adherens junction disassembly.“, *Molecular biology of the cell*. American Society for Cell Biology, 9(8), S. 2185–200.

Powell, D. W., Adegboyega, P. A., Di Mari, J. F. und Mifflin, R. C. (2005) „Epithelial Cells and Their Neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer“, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(1).

Powell, S. und McMillan, T. J. (1990) „DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation“, *Radiotherapy and Oncology*, 19(2), S. 95–108. doi: 10.1016/0167-8140(90)90123-E.

Puck, T. T. und Marcus, P. I. (1956) „Action of x-rays on mammalian cells.“, *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 103(5), S. 653–66.

Qiao, B., Kerr, M., Groselj, B., Teo, M. T. W., Knowles, M. A., Bristow, R. G., Phillips, R. M. und Kiltie, A. E. (2013) „Imatinib radiosensitizes bladder cancer by targeting homologous recombination“, *Cancer Research*, 73(5), S. 1611–1620. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1170.

Radford, I. R. (1985) „Evidence for a General Relationship between the Induced Level of DNA Double-strand Breakage and Cell-killing after X-irradiation of Mammalian Cells“, *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*. Taylor & Francis, 49(4), S. 611–620. doi: 10.1080/09553008514552861.

Ranza, E., Bertolotti, A., Facoetti, A., Mariotti, L., Pasi, F., Ottolenghi, A. und Nano, R. (2009) „Influence of imatinib mesylate on radiosensitivity of astrocytoma cells“, *Anticancer Research*, 29(11), S. 4575–4578. doi: 29/11/4575 [pii].

Rocco, G., Morabito, A., Leone, A., Muto, P., Fiore, F. und Budillon, A. (2016) „Management of non-small cell lung cancer in the era of personalized medicine“, *The international journal of biochemistry {&} cell biology*. Elsevier Ltd, 78, S. 173–179. doi: 10.1016/j.biocel.2016.07.011.

Rofstad, E. K., Mathiesen, B., Henriksen, K., Kindem, K. und Galappathi, K. (2005) „The tumor bed effect: Increased metastatic dissemination from hypoxia-induced up-regulation of metastasis-promoting gene products“, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 65(6), S. 2387–2396. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3039.

Roots, R. und Okada, S. (1975) „Estimation of life times and diffusion distances of

radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells.“, *Radiation research*, 64(2), S. 306–20.

Ropers, H. H. und Craig, I. W. (1989) „Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 12 and 13.“, *Cytogenetics and cell genetics*, 51(1–4), S. 259–79.

Roskelley, C. D., Desprez, P. Y. und Bissell, M. J. (1994) „Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 91(26), S. 12378–82.

Rossi, H. H. und Kellner, A. M. (1972) „Radiation Carcinogenesis at Low Doses“, *Science*, 175(4018), S. 200–202. doi: 10.1126/science.175.4018.200.

Rowe, R. G. und Weiss, S. J. (2009) „Navigating ECM Barriers at the Invasive Front: The Cancer Cell–Stroma Interface“, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), S. 567–595. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175315.

Ruiz de Almodóvar, J. M., Núñez, M. I., McMillan, T. J., Olea, N., Mort, C., Villalobos, M., Pedraza, V. und Steel, G. G. (1994) „Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity.“, *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 69(3), S. 457–62.

Sandfort, V., Koch, U. und Cordes, N. (2007) „Cell adhesion-mediated radioresistance revisited“, *International Journal of Radiation Biology*. Taylor & Francis, 83(11–12), S. 727–732. doi: 10.1080/09553000701694335.

Schwartz, M. A. (2001) „Integrin signaling revisited.“, *Trends in cell biology*. Elsevier, 11(12), S. 466–70. doi: 10.1016/S0962-8924(01)02152-3.

Sekido, Y., Takahashi, T., Ueda, R., Takahashi, M., Suzuki, H., Nishida, K., Tsukamoto, T., Hida, T., Shimokata, K., Zsebo, K. M. und Takahashi, T. (1993) „Recombinant Human Stem Cell Factor Mediates Chemotaxis of Small-Cell Lung Cancer Cell Lines Aberrantly Expressing the c-kit Protooncogene“, *Cancer Research*, 53(7).

Shui, C., Khan, W. B., Leigh, B. R., Turner, A. M., Wilder, R. B. und Knox, S. J. (1995) „Effects of stem cell factor on the growth and radiation survival of tumor cells“, *Cancer research*, 55(15), S. 3431–3437.

Simon-Assmann, P., Kedinger, M., De Arcangelis, A., Rousseau, V. und Simo, P. (1995) „Extracellular matrix components in intestinal development.“, *Experientia*, 51(9–10), S. 883–900.

Simon, E. L., Goel, H. L., Teider, N., Wang, T., Languino, L. R. und FitzGerald, T. . J. (2005) „High dose fractionated ionizing radiation inhibits prostate cancer cell adhesion and $\beta 1$ integrin expression“, *The Prostate*. Wiley-Blackwell, 64(1), S. 83–91. doi: 10.1002/pros.20227.

Simons, M. und Mlodzik, M. (2008) „Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease.“, *Annual review of genetics*. NIH Public Access, 42, S. 517–40. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091432.

Sklar, M. D. (1988) „The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation.“, *Science (New York, N.Y.)*, 239(4840), S. 645–7.

Stanulla, M., Welte, K., Hadam, M. R. und Pietsch, T. (1995) „Coexpression of stem cell factor and its receptor c-Kit in human malignant glioma cell lines“, *Acta Neuropathologica*, 89(2), S. 158–165. doi: 10.1007/BF00296360.

Steel, G. G. (2002) *Basic clinical radiobiology*. Arnold.

Storch, K. (2010) „Einfluss der Chromatinkondensation auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit unter dreidimensionalen Wachstumsbedingungen“.

Storch, K., Eke, I., Borgmann, K., Krause, M., Richter, C., Becker, K., Schröck, E., Cordes, N., Schrock, E. und Cordes, N. (2010) „Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification“, *Cancer research*, 70(10), S. 3925–3934. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3848.

Streuli, C. H., Bailey, N. und Bissell, M. J. (1991) „Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity.“, *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 115(5), S. 1383–95.

Streuli, C. H., Schmidhauser, C., Bailey, N., Yurchenco, P., Skubitz, A. P., Roskelley, C. und Bissell, M. J. (1995) „Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia.“, *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 129(3), S. 591–603.

Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., Birrer, M. J., Rosenberg, R. K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A. F. und Minna, J. D. (1989) „p53: a frequent target for

genetic abnormalities in lung cancer“, *Science (New York, N.Y.)*, 246(4929), S. 491–494. doi: 10.1126/science.2554494.

Tamborini, E., Bonadiman, L., Greco, A., Albertini, V., Negri, T., Gronchi, A., Bertulli, R., Colecchia, M., Casali, P. G., Pierotti, M. A. und Pilotti, S. (2004) „A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient.“, *Gastroenterology*, 127(1), S. 294–9.

Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Török, T. und Hartenstein, V. (1996) „shotgun encodes Drosophila E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia.“, *Genes & development*, 10(6), S. 672–85.

Terzi, F., Henrion, D., Colucci-Guyon, E., Federici, P., Babinet, C., Levy, B. I., Briand, P. und Friedlander, G. (1997) „Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance.“, *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 100(6), S. 1520–8. doi: 10.1172/JCI119675.

Thiery, J. P. (2002) „Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression“, *Nature reviews. Cancer*, 2(6), S. 442–454. doi: 10.1038/nrc822.

Thiery, J. P. (2003) „Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies.“, *Current opinion in cell biology*, 15(6), S. 740–6.

Thiery, J. P., Boyer, B., Tucker, G., Gavrilovic, J. und Valles, A. M. (1988) „Adhesion mechanisms in embryogenesis and in cancer invasion and metastasis.“, *Ciba Foundation symposium*, 141, S. 48–74.

Tuveson, D. A., Willis, N. A., Jacks, T., Griffin, J. D., Singer, S., Fletcher, C. D. M., Fletcher, J. A. und Demetri, G. D. (2001) „STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications“, *Oncogene*, 20(36), S. 5054–5058. doi: 10.1038/sj.onc.1204704.

Veltmaat, J. M., Orelia, C. C., Ward-Van Oostwaard, D., Van Rooijen, M. A., Mummery, C. L. und Defize, L. H. (2000) „Snail is an immediate early target gene of parathyroid hormone related peptide signaling in parietal endoderm formation.“, *The International journal of developmental biology*. UPV/EHU Press, 44(3), S. 297–307. doi: 10.1387/IJDB.10853826.

Vikram, B., Strong, E. W., Shah, J. P. und Spiro, R. (1984) „Failure in the neck following multimodality treatment for advanced head and neck cancer“, *Head & neck*

surgery, 6(3), S. 724–729.

Wang, W.-L. L., Healy, M. E., Sattler, M., Verma, S., Lin, J., Maulik, G., Stiles, C. D., Griffin, J. D., Johnson, B. E. und Salgia, R. (2000) „Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571“, *Oncogene*, 19(31), S. 3521–3528. doi: 10.1038/sj.onc.1203698.

Wang, X., Ren, H., Zhao, T., Chen, J., Sun, W., Sun, Y., Ma, W., Wang, J., Gao, C., Gao, S., Lang, M., Jia, L. und Hao, J. (2014) „Stem cell factor is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection“, *Carcinogenesis*, 35(10), S. 2283–2290. doi: 10.1093/carcin/bgu162.

Wannenmacher, M., Debus, J. und Wenz, F. (2006) *Strahlentherapie*. Springer.

Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C. und Bissell, M. J. (1997) „Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies.“, *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 137(1), S. 231–45.

Weigelt, B., Lo, A. T., Park, C. C., Gray, J. W. und Bissell, M. J. (2010) „HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment.“, *Breast cancer research and treatment*. NIH Public Access, 122(1), S. 35–43. doi: 10.1007/s10549-009-0502-2.

Weinbaum, D. R. (2015) „Complexity and the Philosophy of Becoming“, *Foundations of Science*, 20(3), S. 283–322. doi: 10.1007/s10699-014-9370-2.

Welsch, U., Kummer, W. und Deller, T. (2006) *Lehrbuch Histologie*. 2. Auflage. Herausgegeben von W. Welsch, Ulrich ; Kummer. Urban & Fischer Verlag.

Wheelock, M. J., Knudsen, K. A. und Johnson, K. R. (1996) „Chapter 9 Membrane–Cytoskeleton Interactions with Cadherin Cell Adhesion Proteins: Roles of Catenins as Linker Proteins“, in, S. 169–185. doi: 10.1016/S0070-2161(08)60389-5.

Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J. und Wick, W. (2001) „Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma“, *Cancer research*, 61(6), S. 2744–2750.

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. und Rasmussen, R. P. (2013) „Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification“, *BioTechniques*, 54(6), S. 314–320. doi: 10.2144/000114043.

Woudstra, E. C., Driessen, C., Konings, A. W. und Kampinga, H. H. (1998) „DNA damage induction and tumour cell radiosensitivity: PFGE and halo measurements.“, *International journal of radiation biology*, 73(5), S. 495–502.

Wurm, R., Burnet, N. G., Duggal, N., Yarnold, J. R. und Peacock, J. H. (1994) „Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts.“, *International journal of radiation oncology, biology, physics*. Elsevier, 30(3), S. 625–33. doi: 10.1016/0360-3016(92)90949-I.

Xu, R., Boudreau, A. und Bissell, M. J. (2009) „Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices.“, *Cancer metastasis reviews*. NIH Public Access, 28(1–2), S. 167–76. doi: 10.1007/s10555-008-9178-z.

Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. und Weinberg, R. A. (2004) „Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.“, *Cell*. Elsevier, 117(7), S. 927–39. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.006.

Yasuda, A., Sawai, H., Takahashi, H., Ochi, N., Matsuo, Y., Funahashi, H., Sato, M., Okada, Y., Takeyama, H. und Manabe, T. (2006) „The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells“, *Molecular cancer*, 5, S. 46. doi: 10.1186/1476-4598-5-46.

Yasuda, A., Sawai, H., Takahashi, H., Ochi, N., Matsuo, Y., Funahashi, H., Sato, M., Okada, Y., Takeyama, H. und Manabe, T. (2007) „Stem cell factor/c-kit receptor signaling enhances the proliferation and invasion of colorectal cancer cells through the PI3K/Akt pathway“, *Digestive diseases and sciences*, 52(9), S. 2292–2300. doi: 10.1007/s10620-007-9759-7.

Yasuda, T. und Kurosaki, T. (2008) „Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals“, *Cell Cycle*, 7(23), S. 3634–3640. doi: 10.4161/cc.7.23.7103.

Yoo, J., Kim, C. H., Song, S. H., Shim, B. Y., Jeong, Y. J., Ahn, M. I., Kim, S. W., Cho, D. G., Jo, M. S., Cho, K. Do, Cho, H. J. und Kim, H.-K. (2004) „Expression of c-kit and p53 in non-small cell lung cancers.“, *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*. Korean Cancer Association, 36(3), S. 167–72. doi: 10.4143/crt.2004.36.3.167.

Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. und Colognato, H. (1992) „Laminin forms an independent network in basement membranes.“, *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 117(5), S. 1119–33.

Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W. T., Roberts, A. B., Neilson, E. G., Sayegh, M. H., Izumo, S. und Kalluri, R. (2007) „Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis“, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 13(8), S. 952–961. doi: 10.1038/nm1613.

Zeisberg, M. und Neilson, E. G. (2009) „Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions.“, *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 119(6), S. 1429–37. doi: 10.1172/JCI36183.

Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H. und Kalluri, R. (2007) „Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition.“, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 282(32), S. 23337–47. doi: 10.1074/jbc.M700194200.

Zhang, M., Ma, Q., Hu, H., Zhang, D., Li, J., Ma, G., Bhat, K. und Wu, E. (2011) „Stem cell factor/c-kit signaling enhances invasion of pancreatic cancer cells via HIF-1alpha under normoxic condition“, *Cancer letters*, 303(2), S. 108–117. doi: 10.1016/j.canlet.2011.01.017.

Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A. und Shanahan, C. M. (2001) „Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues.“, *Journal of cell science*, 114(Pt 24), S. 4485–98.

Zoltan-Jones, A., Huang, L., Ghatak, S. und Toole, B. P. (2003) „Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells.“, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(46), S. 45801–10. doi: 10.1074/jbc.M308168200.

Zsebo, K. M., Smith, K. A., Hartley, C. A., Greenblatt, M., Cooke, K., Rich, W. und McNiece, I. K. (1992) „Radioprotection of mice by recombinant rat stem cell factor“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), S. 9464–9468. doi: 10.1073/pnas.89.20.9464.

9. Anhang

9.1. Veröffentlichungen

Publikationen

Originalarbeiten

F. Eberle, **M. F. Saulich**, F. H. Leinberger, W. Seeger, R. Engenhardt-Cabillic, E. Dikomey, J. Hänze, K. Hattar, F. S. B. Subtil (2016). *Cancer cell motility is affected through 3D cell culturing and SCF/c-Kit pathway but not by X-irradiation*. Radiotherapy and Oncology, 119(3), 537–543.

F. Eberle, F. H. Leinberger, **M. F. Saulich**, W. Seeger, R. Engenhardt-Cabillic, J. Hänze, K. Hattar, E. Dikomey, F. S. B. Subtil (2017). *In cancer cell lines inhibition of SCF/c-Kit pathway leads to radiosensitization only when SCF is strongly over-expressed*. Clinical and Translational Radiation Oncology, 2, 69–75.

M. F. Saulich, S. C. Kölzer, H. Held, M. A. Verhoff, S. Plenzig (2017). *Todesfälle im Hotel*. Arch. Kriminol. 240: 200-211.

Posterpräsentationen

F. Eberle, M. Meisner, **M. F. Saulich**, F. H. Leinberger, W. Seeger, R. Engenhardt-Cabillic, F. S. B. Subtil (2015). *Einfluss des SCF/cKIT-Pathways auf das Metastasierungsverhalten von NSCLCs nach Photonenbestrahlung*. Posterpräsentation 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Hamburg, 25.-28.06.2015.

M. Meisner, F. Eberle, F. H. Leinberger, **M. F. Saulich**, W. Seeger, R. Engenhardt-Cabillic, F. S. B. Subtil (2015). *Untersuchung des Einflusses von c-KIT auf das klonogene Überleben nach Photonenbestrahlung an der NSCLC-Zelllinie H1975*. Posterpräsentation 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Hamburg, 25.-28.06.2015.

M. F. Saulich, F. Eberle, M. Meisner, F. H. Leinberger, W. Seeger, R. Engenhardt-Cabillic, F. S. B. Subtil (2015). *Die Rolle von SCF/c-Kit Signalweg nach Photonenbestrahlung in humanen NSCLCs*. Posterpräsentation 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Hamburg, 25.-28.06.2015.

Vorträge

M. F. Saulich, S. C. Kölzer, H. Held, M. A. Verhoff, S. Plenzig (2017). *Todesfälle im Hotel*. Vortrag 26. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (Region Süd), Freiburg/Br., 23.-24.06.2017.

9.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Universität des Saarlandes:

Prof. Dr. Bohle	Dr. Becker	Prof. Dr. Bruns
Dr. Burkholder	Prof. Dr. Eichler	Prof. Dr. Graf
PD Dr. Gräber	Prof. Dr. Herrmann	Prof. Dr. Hoth
Dr. Kappl	PD Dr. Krause	Prof. Dr. Lipp
Prof. Dr. Dr. Maurer	Prof. Dr. Meier	Prof. Dr. Montenarh
Prof. Dr. Niemeyer	PD Dr. Philipp	Prof. Dr. Schmitz
Dr. Schwarz	Prof. Dr. Smola	PD Dr. Speicher
Prof. Dr. Tschernig	PD Dr. von Müller	Prof. Dr. Walldorf
Prof. Dr. Welter	Prof. Dr. Wennemuth	Prof. Dr. Zimmermann
Prof. Dr. Dr. Zufall		

Justus-Liebig-Universität Gießen:

PD Dr. Abdallah	Prof. Dr. Acker	Dr. Ahlbrecht
Prof. Dr. Akintürk	Dr. Altmann	Dr. Ankele
Prof. Dr. Axt-Fliedner	Dr. Bandorski	Dr. Bauer
Dr. Bayer	Prof. Dr. Bein	PD Dr. Birk
Dr. Blau	Prof. Dr. Böning	Dr. Brück
Dr. Burchardt	Prof. Dr. Chakraborty	Prof. Dr. Christophis
Dr. Daniel	Prof. Dr. Deinsberger	Prof. Dr. Dr. Dettmeyer
Dr. Deubner	Prof. Dr. Dill	Prof. Dr. Dreyer
Dr. Eckhard	Prof. Dr. Eikmann	Dr. Eisele
Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic	PD Dr. Enzensberger	Prof. Dr. Erdogan
Dr. Erkapic	Dr. Eul	Dr. Ewald
Dr. Faas	Dr. Ferring	Dr. Feustel
Dr. Fischer	Dr. Franzen	Prof. Dr. Ganß
Prof. Dr. Gattenlöhner	Dr. Gessler	Prof. Dr. Ghofrani
Dr. Gissel	Prof. Dr. Gräf	Dr. Grandel
Prof. Dr. Grimminger	Dr. Groß	Dr. Gründüz
Prof. Dr. Günther	Prof. Dr. Günther	Prof. Dr. Hackstein
Prof. Dr. Hamm	Prof. Dr. Hardt	Dr. Hattar
Dr. Hecker	Prof. Dr. Dr. Heiß	Dr. Hermann
Prof. Dr. Herr	Dr. Hirschburger	Dr. Hoffmann

Anhang

PD Dr. Hörbelt	Dr. Jaeger	Dr. Jessen
PD Dr. Jödicke	Prof. Dr. Jung	PD Dr. Jurkat
Prof. Dr. Jux	PD Dr. Käbisch	Prof. Dr. Kaps
Dr. Karle	Prof. Dr. Kemkes-Matthes	PD. Dr. Knappe
Dr. Körlings	Prof. Dr. Kreuder	Dr. Krieger
Prof. Dr. Krombach	Dr. Kruchten	Prof. Dr. Kruse
Prof. Dr. Kruse	Dr. Lang	Prof. Dr. Lange
Prof. Dr. Leweke	Prof. Dr. Linn	Prof. Dr. Lorenz
Prof. Dr. Lübbecke	Dr. Martin	Prof. Dr. Mayer
Dr. Meier	Prof. Dr. Meinhold-Heerlein	Prof. Dr. Möllmann
Dr. Most	Prof. Dr. Mulert	Prof. Dr. Müller-Ladner
Dr. Nährlich	Prof. Dr. Nef	Prof. Dr. Neubauer
PD Dr. Neuhaus	Prof. Dr. Neumann	Dr. Noehte
Dr. Oehmke	Prof. Dr. Oertel	Prof. Dr. Padberg
Dr. Parahuleva	Dr. Pilatz	Dr. Renner
Prof. Dr. Renz	Dr. Repp	PD Dr. Reuter
Prof. Dr. Rickert	Dr. Rixe	Prof. Dr. Roeb
Dr. Rolf	Prof. Dr. Rummel	Prof. Dr. Rummel
Prof. Dr. Sachs	Prof. Dr. Sander	Prof. Dr. Schäffler
Dr. Schaller	PD Dr. Scharbrodt	Dr. Schmidt
Dr. Schmitt	Prof. Dr. Schneider	Prof. Dr. Schneider
Prof. Dr. Schulz	Prof. Dr. Schuppe	Dr. Schüttle
Prof. Dr. Sedding	Prof. Dr. Seeger	Prof. Dr. Sibelius
Prof. Dr. Snipes	Dr. Sperzel	Dr. Speth
Dr. Stein	Prof. Dr. Steinmeyer	PD Dr. Dr. Stieger
Prof. Dr. Stracke	Prof. Dr. Struffert	PD Dr. Strunk
Dr. Tarnier	PD Dr. Teichmann	Dr. Temmesfeld-Wollbrück
Dr. Tiede	Prof. Dr. Uhl	Prof. Dr. Wagenlehner
Prof. Dr. Walmrath	Dr. Wassill	Prof. Dr. Weigand
Prof. Dr. Weimer	Dr. Weinand	Dr. Willems
Prof. Dr. Winking	Prof. Dr. Wittekindt	Dr. Zandt
Prof. D. Ziebuhr	Prof. Dr. Zimmer	

weitere:

Prof. Dr. Alscher	PD. Dr. Bissinger	Dr. Pröbstel
PD Dr. Schumacher	Prof. Dr. Verhoff	Dr. Zieger

9.3. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic für die Vergabe des interessanten Themas, für die umfassende Förderung und die kompetente fachliche Betreuung. Bei Frau Dr. F. Subtil und Herrn Dr. F. Eberle bedanke ich mich für die Bereitschaft der Betreuung dieser Arbeit. In ihnen hatte ich kompetente und engagierte Ansprechpartner für alle Fragen und Probleme. Weiterhin danke ich allen Beteiligten des Instituts für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Gießen, insbesondere den Herren Dr. Bosold, Dr. Lewe-Schlosser, Dr. Tsogtbaatar und Dr. Wolff, die während der Strahlzeiten für einen soweit als möglich reibungslosen Versuchsablauf sorgten. Herrn Dr. J. Wilhelm und Frau S. Ziegler möchte ich für die gute Zusammenarbeit und insbesondere für die Möglichkeit der Mitnutzung einiger Geräte zur Durchführung der Real-Time PCR danken. Herrn F. Leinberger danke ich für die hervorragende Einarbeitung, Zusammenarbeit und ein stets offenes Ohr. Für die praktische Einarbeitung im Labor sowie stets helfende Hände und gute Ideen möchte ich auch Frau M. Y. Gökyildirim danken. Außerdem danke ich dem gesamten Team unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und viele vergnügliche Momente im Laboralltag.

Für die moralische Unterstützung danke ich meiner Familie und lieben Freunden, die immer, wenn es nötig war, aufmunternde Worte wussten. Insbesondere möchte ich Sarah Normann und Nadja Skowron danken, ohne die ich nie zu dieser Arbeit gekommen wäre.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank Simon, der mich bei all meinen Vorhaben und Ideen immer mit allen Kräften unterstützt, mir stets Rückhalt gibt und immer für mich da ist. Danke!